

**Institut für Biochemie I**  
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena



und

**Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie**  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Isoformspezifische *down*-Regulierung  
konventioneller Calpaine in Tumorzellen:  
Auswirkungen auf die Migration  
und andere zelluläre Funktionen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

von

**Dipl.-Ing. (FH) Oliver Helmut Popp**

aus Aschaffenburg

*Für meine Eltern*

---

**Gutachter**

- 1. Herr Prof. Dr. Bernd Wiederanders** (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
- 2. Frau Prof. Dr. Marianne Jochum** (Ludwig-Maximilians-Universität München)
- 3. Frau Prof. Dr. Klaudia Brix** (International University Bremen)

**Tag des Rigorosums:**

**19. Juni 2006**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**26. Juli 2006**

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>A</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
B.1	Bedeutung von Proteasen .....	3
B.1.1	<u>Cysteinproteasen</u> .....	4
B.1.2	<u>Calpaine</u> : $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cysteinproteasen .....	4
B.1.2.1	Strukturelle Eigenschaften konventioneller Calpaine .....	6
B.1.2.2	Regulation der Calpain-Aktivität .....	8
B.2	Mechanismen der Zellmigration .....	10
B.2.1	<u>Zellmatrix und Integrine</u> .....	13
B.2.1.1	Integrine als Rezeptoren für ECM-Proteine .....	14
B.2.1.2	Integrine als bidirektionale Signalmoleküle .....	17
B.3	Zur Rolle der konventionellen Calpaine und MMP-Regulations- mechanismen bei der Zellmigration .....	19
B.4	Fragestellung und Ziele der Arbeit .....	23
B.4.1	<u>Zielsetzung 1</u> : Down-Regulation von isoformspezifischen Calpain-Proteinen in verschiedenen Zellsystemen und Analyse diverser Zellfunktionen .....	23
B.4.2	<u>Zielsetzung 2</u> : Identifizierung von potentiell isoformspezifischen Calpain-Substraten bei der Zellmigration .....	24
B.4.3	<u>Zielsetzung 3</u> : Untersuchung der Calpain-Beteiligung bei Signaltransduktionsmechanismen der MMP-Expression .....	24
<b>C</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
C.1	Material .....	25
C.1.1	<u>Geräte</u> .....	25
C.1.2	<u>Bioinformatische Hilfsmittel</u> .....	27
C.1.3	<u>Chemikalien und Reagenzien</u> .....	28
C.1.3.1	Allgemeine Chemikalien .....	28
C.1.3.2	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken .....	29
C.1.3.2.1	Vektoren .....	29
C.1.3.2.2	Oligonukleotide für PCR, RNAi, Mutagenese und Plasmidkonstruktion .....	32
C.1.3.3	Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken .....	34
C.1.3.4	Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken .....	35
C.1.3.5	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken .....	36
C.1.3.6	Substrate und Inhibitoren .....	36
C.1.3.7	Weitere Proteine und Antikörper/Konjugate .....	36
C.2	Methoden .....	38
C.2.1	<u>Molekularbiologische Methoden</u> .....	38
C.2.1.1	Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen .....	38
C.2.1.1.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	38

C.2.1.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	38
C.2.1.1.3	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten .....	38
C.2.1.1.4	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA- und RNA-Fragmenten....	39
C.2.1.1.5	Herstellung von siRNAs und shRNA-Kassetten durch Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	39
C.2.1.1.6	Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	39
C.2.1.1.7	Elution von DNA aus dem Agarose-Gel.....	40
C.2.1.1.8	DNA-Präzipitation .....	40
C.2.1.1.9	DNA-Sequenzierung .....	40
C.2.1.2	Post-transkriptionelle Genrepression mittels RNAi .....	40
C.2.1.3	Herstellung der Talin-Mutanten durch zielgerichtete Mutagenese .....	41
C.2.1.4	Zusammenfassung aller hergestellten und verwendeten Plasmide .....	41
C.2.1.5	Isolierung von RNA aus Zellen .....	42
C.2.1.6	cDNA-Synthese .....	42
C.2.1.7	cDNA-Array.....	42
C.2.1.8	Quantitative RT-PCR .....	43
C.2.2	<u>Mikrobiologische Methoden</u> .....	44
C.2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter XL-10 Gold <i>E. coli</i> Zellen.....	44
C.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Stämme .....	45
C.2.2.3	Kultivierung und Selektion transformierter <i>E. coli</i> Stämme.....	45
C.2.2.3.1	Wachstumsmedien .....	45
C.2.2.3.2	Antibiotika als Selektionsmittel.....	45
C.2.2.3.3	Beimpfen und Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	45
C.2.2.3.4	Herstellung und Lagerung der <i>E. coli</i> Stammsammlung .....	46
C.2.3	<u>Zellbiologische Methoden</u> .....	46
C.2.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	46
C.2.3.2	Kultivierung von Säugetierzellen.....	46
C.2.3.3	Splitten konfluenter Zelllinien .....	46
C.2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	47
C.2.3.5	Differenzierung und Analyse der Leukämiezelllinie THP-1 .....	47
C.2.3.6	Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern.....	48
C.2.3.7	Lipofektion von Plasmid-DNA und siRNA.....	48
C.2.3.8	Epifluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie .....	49
C.2.3.9	Protein-Protein Interaktionsstudien.....	50
C.2.3.9.1	Konfokale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie .....	50
C.2.3.9.2	Bestimmung der Liganden-Bindungsaffinität von Integrin $\alpha_v\beta_3$ .....	50
C.2.3.10	Apoptose-Studien .....	51
C.2.3.10.1	Nuklearkondensation von ECFP-H2Ai transfizierten AS-Zellen .....	51
C.2.3.10.2	Unterscheidung von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie .....	51
C.2.3.10.3	Bestimmung der Zytotoxizität von Ionomycin .....	52
C.2.3.11	Bestimmung der Calpain- und Caspase-Aktivität in lebenden Zellen .....	52
C.2.3.12	Zellmigrationsstudien.....	53
C.2.3.12.1	Bestimmung der Zellmigration .....	53
C.2.3.12.2	Bestimmung der Transmigration.....	54
C.2.3.13	Zellzyklus- und Proliferationsstudien .....	55
C.2.3.13.1	Zellsynchronisierung mittels <i>Mitotic-shake-off</i> .....	55
C.2.3.13.2	Zellzyklus-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie .....	55
C.2.3.13.3	Bestimmung der Zellproliferation.....	56
C.2.4	<u>Proteinchemische Methoden</u> .....	56
C.2.4.1	Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen .....	56

C.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	57
C.2.4.3	Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse .....	57
C.2.4.3.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
C.2.4.3.2	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran .....	57
C.2.4.3.3	Immundetektion der Zielproteine.....	58
C.2.4.4	Bestimmung der endogenen Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz .....	59
C.2.4.5	Bestimmung der Calpain-Aktivität mittels Caseinzymographie .....	59
C.2.4.6	Bestimmung der MMP-Aktivität mittels Gelatinezymographie.....	60
C.2.4.7	Bestimmung der <i>pan</i> PKC-Aktivität.....	60
<b>D</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
D.1	<i>Down</i> -Regulierung der Calpain-Expression und Zellfunktionsanalysen .....	61
D.1.1	<u>Charakterisierung der Calpain-AS-Zelllinien</u> .....	61
D.1.1.1	Spezifische Reduktion der Calpain-Expression bei <i>capn1AS</i> und <i>capn2AS</i> .....	61
D.1.1.2	Morphologische Unterschiede bei <i>capn1AS</i> und <i>capn2AS</i> .....	65
D.1.1.3	Unterschiedliches Proliferationsverhalten der AS-Zelllinien .....	66
D.1.1.4	Apoptoseinduktion in AS-Zelllinien bei subkonfluenter Kultivierung.....	66
D.1.1.5	Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression .....	69
D.1.1.6	Unterschiedliche cDNA-Profile von Signaltransduktionsfaktoren und assoziierten Genprodukten in AS- und Kontrollzellen .....	72
D.1.1.7	Verändertes Migrationsverhalten von <i>capn1AS</i> und <i>capn2AS</i> im Vergleich zu THP-1-Zellen.....	74
D.1.1.8	Verändertes Integrin-Verhalten bei AS-Zellen .....	76
D.1.1.9	Störung der Kehrseitenablösung bei <i>capn2AS</i> und Wiederherstellung durch Überexpression eines ECFP-CP2 Vektors .....	79
D.1.1.10	Wiederherstellung der HeLa-typischen Morphologie in <i>capn1AS</i> -Zellen durch Überexpression eines ECFP-CP1 Vektors .....	81
D.1.2	<u>Herstellung von pRNAi-Systemen und Charakterisierung von Calpain-RNAi-Zellen</u> .....	82
D.1.2.1	Herstellung des pRNAi-Vektors .....	82
D.1.2.2	Etablierung von pRNAi-Systemen in Hek293- und HeLa-Zellen .....	84
D.1.2.3	Isoformspezifisches Migrationsverhalten von Calpain-pRNAi-Zellen .....	88
D.2	Identifizierung von isoformspezifischen Calpain-Substraten bei der Zellmigration.....	89
D.2.1	<u>Proteine der RhoA-Familie als mögliche Calpain-Substrate</u> .....	89
D.2.2	<u>Talin als potentiell spezifisches Substrat von mCP</u> .....	90
D.2.2.1	Herstellung und Charakterisierung von verkürzten Talin-Varianten.....	92
D.2.2.1.1	Herstellung der Talin-Varianten .....	92
D.2.2.1.2	Lokalisation der verkürzten Talin-Varianten in HeLa-Zellen .....	94
D.2.2.1.3	Talin-Varianten bei der Zellmigration .....	96
D.2.2.2	Herstellung und Charakterisierung Calpainolyse-sensitiver und -resistenter Talin-Mutanten.....	96
D.2.2.2.1	Modellierung Calpainolyse-sensitiver und -resistenter Talin-Mutanten.....	97
D.2.2.2.2	Funktionalitätsüberprüfung der Talin-Mutanten.....	99
D.2.2.2.3	Talin-Mutanten bei der Zellmigration.....	102

D.3	Beeinflussung von MMP-Regulationsmechanismen durch m-Calpain .....	103
D.3.1	Verminderte Expression und Freisetzung von MMPs nach Langzeit-Präinkubation von Tumorzelllinien mit spezifischen Calpain-Inhibitoren .....	103
D.3.2	Verringerte Zellmembran-Lokalisierung und Freisetzung von MMP-2 bei CP2-supprimierten HeLa-Zellen .....	107
D.3.3	Kolokalisierung von Talin-Varianten/-Mutanten mit (Pro)MMP-2 in <i>capn2AS</i> -Zellen .....	109
D.3.4	Beeinträchtigung intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen bei der m-Calpain-abhängigen Regulation von MMP-2 .....	111
D.3.4.1	Unterbrechung des ERK/MAPK-Signalweges bei <i>capn2AS</i> .....	111
D.3.4.2	Beeinträchtigung der Rekrutierung von Grb2 und Ras an die Zellmembran bei <i>capn2AS</i> .....	112
D.3.4.3	Verminderte PKC $\alpha$ / $\beta$ II-Aktivität bei <i>capn2AS</i> .....	113
<b>E</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>115</b>
E.1	Isoformspezifische <i>down</i> -Regulierung konventioneller Calpaine und ihre Auswirkung auf die Expression diverser Genprodukte .....	115
E.2	Einfluss von $\mu$ CP und mCP auf den Zellzyklus und die Apoptose...	124
E.3	Calpaine als isoformspezifische Modulatoren der Zellmorphologie und Tumorzellmigration .....	127
E.4	Korrelation der Transkription von MMP-2 mit der Aktivität von m-Calpain .....	133
E.5	<i>Inside-out</i> $\rightarrow$ <i>outside-in</i> -Regulation bei der Talin <i>head</i> -vermittelten Integrin-Aktivierung und MMP-Transkription .....	136
E.6	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	138
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>G</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>161</b>
<b>H</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>162</b>
<b>I</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>165</b>

## Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit gelten die allgemein gültigen Ein- und Dreibuchstabenkodes für Aminosäuren nach der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur.

### *Abkürzungen für Einheiten*

bp	Basenpaare
nt	Nukleotide
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
Pa	Pascal, $1 \times 10^5$ Pascal = 1 bar
RFU	relative Fluoreszenz <i>units</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenanteil in Prozent
w/v	Gewichtsanteil in Prozent

### *Abkürzungen für Elemente des Calpain-Systems*

μCP	μ-Calpain
mCP	m-Calpain
CP1	Calpain 1, große katalytische Untereinheit von μCP, auch μ80K genannt
CP2	Calpain 2, große katalytische Untereinheit von mCP, auch m80K genannt
CP4	Calpain 4, kleine regulatorische Untereinheit von μCP und mCP, auch 30K genannt
CAST	Calpastatin
CP1B	acetyliertes Calpastatin-Peptid

### *Allgemein gültige und anerkannte Abkürzungen für RNA-Polynukleotide*

dsRNA	<i>double strand</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA

### *Allgemein gültige und anerkannte Abkürzungen für Proteine und andere Moleküle*

AA	Arachidonsäure
Ago 2	Argonaut 2
Arp2/3	<i>actin-related protein</i> 2/3
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSP	<i>bone sialo protein</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CRBPI	<i>cellular retinol binding protein</i> I
CXCR3	Cys-X-Cys Chemokin-Rezeptor 3
DAG	Diacylglycerol
Del-1	<i>developmental locus-1</i>
DISC	<i>death-induced signaling complex</i>
Dkk	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol



dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EN1	<i>engrailed 1</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FasL	Fas-Ligand
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Grb2	<i>growth factor receptor bound 2</i>
GSK-3 $\beta$	Glycogensynthasekinase-3 $\beta$
HIP	<i>hedgehog-interacting protein</i>
iC3b	<i>inactive complement factor 3b</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
ICAM	<i>intracellular CAM</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor I</i>
IGFBP-3	<i>insulin-like growth factor binding protein-3</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IP-10	<i>interferon-inducible protein 10</i>
IRF-1	<i>interferon-regulatory factor-1</i>
LEE-CAM	<i>lymphocyte-endothelial-epithelial-CAM</i>
MAdCAM	<i>mucosal adressin CAM</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MARKS	myristyliertes Ala-reiches C-Kinase-Substrat
MEK	MAPK kinase
MEKK1	MEK kinase 1
MIG	<i>monokine inducible by gamma interferon</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MT1-MMP	<i>matrix type 1-MMP</i>
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat, reduziert
Noxa	NADPH oxidase activator
OAS	2',5'-Oligoadenylatsynthetase
P <sub>i</sub>	Orthophosphat
PAK1	p21-activated kinase 1
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PGR	<i>progesterone receptor</i>
PI <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PINCH	<i>particularly interesting new Cys-His protein</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPKI $\gamma$	Phosphatidylinositol Phosphatkinase I $\gamma$
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteintyrosinkinase- $\beta$
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PSA	<i>prostate specific antigene</i>

PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
PYK	<i>Pro-rich Tyr kinase</i>
Rb	<i>Retinoblastoma Tumorsupressorprotein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNP	<i>Ribonukleotidprotein-Komplex</i>
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
TNFR-1	<i>TNF-<math>\alpha</math> Rezeptor-1</i>
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VCAM	<i>vascular CAM</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrom protein</i>
WISP-1	<i>Wnt-1-induced secreted protein-1</i>

***Allgemein gültige und anerkannte Abkürzungen für Transkriptionsfaktoren und Bindungselemente***

AP-1	<i>activating protein-1</i>
CCAAT	<i>CCAAT-binding proteins</i>
CIZ	<i>Cas-interacting zinc-finger protein</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
GA und CA	<i>GA- und CA-Wiederholungen</i>
HFH3	<i>hepatocyte nuclear factor-3</i>
KRE-M9	<i>keratinocyte differentiation factor-1 responsible element-4</i>
NF-1	<i>nuclear factor-1</i>
NF-E1	<i>nuclear factor-E1 (p45)</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor-kappaB (p65)</i>
OSE-2	<i>osteoblast specific element-2</i>
p53BE	<i>p53-binding element</i>
RARE	<i>retinoic acid-responsive element</i>
RORA	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha</i>
TIE	<i>TGF-<math>\beta</math> inhibitory element</i>
TRE	<i>thyroid hormone-responsive element</i>
TRF	<i>octamer-binding protein</i>
LBP-1	<i>leader-binding protein-1</i>
SBE	<i>STAT-binding element</i>
SPRE	<i>stromelysin-1 platelet derived growth factor B PDGF-responsive element</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
ZBP-89	<i>89 kDa-zinc-binding protein</i>

***Weitere in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen***

ALLN	<i>N-acetyl-Leu-Leu-Norleucinal</i>
AP	<i>alkalische Phosphatase</i>
AS	<i>antisense</i>
BAE	<i>bovine aortic endothelial</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
CALI	<i>chromophore-assisted laser inactivation</i>
CI4	<i>Calpain-Inhibitor 4</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>doppelt destilliertes Wasser</i>

ECM	<i>extra cellular matrix</i>
FERM	<i>four-point-one</i> , Ezrin, Radixin, Moesin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMK	Fluormethylketon
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRT	<i>Flp-recombinase target</i>
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GST	Glutathion-S Transferase
Hek293	<i>human embryonic kidney</i> 293
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IP	Immunopräzipitation
KO	<i>knock out</i>
LF	Lipofectamine 2000
LP	Langpassfilter
MCS	<i>multiple cloning site</i>
n. d.	nicht durchgeführt
NHMec	Aminomethylcoumarin
NP40	Nonident P-40
P	phospho-
PA	Polyadenylierungsstelle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PEF	<i>penta</i> EF-Hand
PI	Propidiumjodid
PK	Polynukleotidkinase
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PTB	Phosphotyrosinbindungsdomäne
PTGS	<i>posttranscriptional gene silencing</i>
POC	<i>perfusion, open and closed cultivation</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RP	Rhodamin-Phalloidin
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2/SH3	<i>Scr-2 homology domain</i> 2/3
SSPE	<i>sodium chloride-sodium phosphate</i> -EDTA
Suc	Succinyl-
t <sub>0,5</sub>	mittlere Halbwertszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>tris buffered saline with</i> Tween-20
WFR	Wachstumsfaktoren-Rezeptoren
Z-	Benzyloxycarbonyl

## A Zusammenfassung

Die neutralen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cysteinproteinasen  $\mu$ - und m-Calpain, auch konventionelle Calpaine genannt, werden ubiquitär exprimiert. Sie stellen heterodimere Enzyme dar, die aus einer unterschiedlichen großen katalytischen Untereinheit, Calpain 1 für  $\mu$ -Calpain und Calpain 2 für m-Calpain, sowie einer identischen kleinen regulatorischen Untereinheit, Calpain 4, aufgebaut sind. *Knock-out* (KO)-Experimente wiesen auf zahlreiche, zum Teil lebenswichtige (intra-)zelluläre Funktionen der ubiquitären Calpaine hin. So zeigten unter anderem Untersuchungen mit embryonalen Calpain 4-KO-Fibroblasten die Beteiligung der konventionellen Calpaine bei zellulären Migrationsprozessen auf. Obwohl bereits für eine Vielzahl von potentiellen Calpain-Substraten, wie etwa den intrazellulären fokalen Adhäsionsproteinen FAK und Talin, eine wichtige Bedeutung bei der Zellmigration postuliert wurde, sind die zugrunde liegenden Mechanismen der Zellmigration noch weitgehend ungeklärt. Zudem ist offen, ob gegebenenfalls die beiden Calpain-Isoformen  $\mu$ - und m-Calpain äquivalent oder isoformspezifisch an Migrationsmechanismen und potentiell assoziierten regulierten Abbauprozessen beteiligt sind.

Ein Hauptziel meiner Untersuchungen war daher, mittels geeigneter Methoden weitere Beiträge zur Aufklärung von zellulären Migrationsprozessen zu liefern, und zwar insbesondere durch die Identifikation potentiell beteiligter Substrate, Interaktionspartner und Signaltransduktionswege bei der Tumorzellmigration. Dies gelang durch die Etablierung und Charakterisierung von Calpain-*knock down*-Zellmodellen. Mit diesen Modellen sollten aber auch weitere Zellfunktionen wie etwa die Zellproliferation, die Zellzyklusprogression, die Apoptoseinduktion und die Expression von Matrix-Metalloproteinasen näher untersucht werden.

Ein Großteil der bisherigen Erkenntnisse darüber, wie Calpaine in Zellmigrationsprozesse involviert sein könnten, wurde mit Hilfe von zellbasierten Modellen unter Einsatz von Calpain-Inhibitoren gewonnen, die jedoch unspezifisch beide Isoformen hemmen. Da wir allerdings an einer differenziellen Betrachtung der Beteiligung von  $\mu$ - und m-Calpain vor allem bei der Tumorzellmigration interessiert waren, wurden *antisense* (AS)- und RNAi-basierte Strategien für die *down*-Regulierung der Expression von Calpain 1, 2 und 4 in HeLa-Zellen angewandt.

Die *down*-Regulierung der Calpaine ergab eine isoformspezifische Regulierung des morphologischen Phänotyps. Die Verringerung von Calpain 1 durch *capn1AS* resultierte in kleinen, kopfsteinpflasterartigen Zellen, die eine erhöhte Transmigrationsrate durch Matrigel, Vitronektin und Fibronektin aufwiesen. Diese korrelierte mit der Akkumulierung von RhoA und der vermehrten mRNA-Expression von VCAM-1, WISP-1, -2 und -3.

Im Gegensatz dazu wuchsen durch *capn2AS* in ihrem Calpain 2-Gehalt verminderte Zellen in langgestreckter Spindelform mit einer Anhäufung Filopodien-artiger Strukturen. Die Transmigrationsfähigkeit war im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert. *Time lapse*-Videomikroskopieanalysen zeigten eine Störung der Kehrseitenablösung von *capn2AS*-Zellen, die nach der Überexpression von Calpain 2 wiederhergestellt werden konnte.

Die verringerte Transmigrationsfähigkeit von *capn2AS*-Zellen korrelierte zudem mit einer beeinträchtigten Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Signalübertragung als mögliche Folge des fehlenden intrazellulären Integrin-assoziierten Talin-Spaltproduktes. Für die Untersuchung der Calpain-vermittelten Beteiligung des Talin-Spaltproduktes bei der Zellmigration wurden verkürzte Talin-Varianten sowie Calpainolyse-resistente (L<sup>432</sup>M/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M) und -sensitive (Y<sup>436</sup>P) Talin-Mutanten als *enhanced yellow fluorescent*-Fusionsproteine in HeLa- und *capn2AS*-Zellen überexprimiert. Dabei zeigten sowohl Talin *head*-EYFP und Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP neben einer verstärkten Membranlokalisierung eine Rekonstitution des Migrations- und Transmigrationsverhaltens von *capn2AS*-Zellen. Die Überexpression von Talin *head*-EYFP und Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP in *capn2AS*-Zellen bewirkte außerdem eine deutliche Kollokalisierung von (Pro)MMP-2 mit F-Aktin-reichen Membranstrukturen.

Zur Überprüfung einer möglicherweise Calpain-regulierten MMP-Expression wurden zunächst die monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 und nicht-transfizierte HeLa-Zellen mit spezifischen Calpain-Inhibitoren behandelt. Nur eine Langzeit-Präinkubation mit den Hemmstoffen resultierte in einer vom Differenzierungsgrad unabhängigen verringerten Matrigel-Transmigrationsrate sowie einer reduzierten Expression von MMP-2 und -9 in THP-1-Zellen bzw. in einer verminderten Transmigrationsfähigkeit und MMP-2-Expression von HeLa-Zellen. Wie weitere Untersuchungen zeigten, wiesen auch *capn2RNAi*- und *capn4RNAi*-Zellen eine reduzierte Expression von MMP-2 auf. Dies korrelierte mit einer Beeinträchtigung der MEK/ERK-Phosphorylierungskaskade, einer verringerten Vitronektin-stimulierten PKC $\alpha$ -Phosphorylierung und einer verminderten Membranlokalisierung der Signalmoleküle Grb2 und Ras sowie mit einer reduzierten mRNA-Expression von c-fos und JunB.

Darüber hinaus ließ die eingehende Charakterisierung von subkonfluent kultivierten, synchronisierten *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen eine deutliche Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch eine Arretierung in der G1/G0-Phase (Fehlen des Cyclin D1-Spaltproduktes und verminderte Expression phosphorylierten Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins an Ser<sup>249</sup>/Thr<sup>252</sup> bei *capn1AS*; Akkumulierung der CDK-Inhibitoren p15<sup>Ink4B</sup>, p19<sup>Ink4D</sup>, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> bei *capn1AS* und *capn2AS*) erkennen. Zusätzlich war eine erhöhte Apoptoseneigung (Nuklearkondensation, DNA-Fragmentierung, Suc-DEVD-NHMeC- und Pro-Caspase 9-Spaltung sowie eine gesteigerte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und FasL) bei den subkonfluenten *capn1AS*-Zellen nachzuweisen.

Basierend auf den in dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnissen kann postuliert werden, dass vor allem der m-Calpain-vermittelten Proteolyse von Talin wichtige funktionelle und transkriptionelle Modulations- und Regulationsaufgaben bei der Tumorzellmigration zukommen. Daneben werden aber auch diverse andere Zellfunktionen wie z. B. die Expression bestimmter Matrix-Metalloproteinasen, das Proliferationsverhalten, die Zellzyklusprogression und die Apoptoseinduktion Calpain-isoformspezifisch reguliert.

## B Einleitung

### B.1 Bedeutung von Proteasen

Zur großen Gruppe der Proteasen gehören intra- und extrazellulär vorkommende hydrolytische Enzyme, die Peptidbindungen selektiv spalten können und daher auch Peptidasen genannt werden. Unspezifische sowie limitierte proteolytische Vorgänge sind für die Aufrechterhaltung humoraler und zellulärer Funktionen unerlässlich und ein Garant für die Homöostase des gesamten Organismus. Die essentielle Bedeutung dieser Enzymklasse lässt sich an vielen physiologischen Prozessen erkennen. So werden etwa bei der Nahrungsverwertung zugeführte Proteine als Vorbereitung für die anschließende Resorption durch sekretierte Proteasen im Verdauungstrakt unspezifisch bis hin zu einzelnen Aminosäuren hydrolysiert. Limitierte proteolytische Prozesse sind für die Gerinnung und Fibrinolyse sowie für die Aktivierung von Zytokinen und Peptidhormonen verantwortlich. Daneben erfüllen Proteasen wichtige Schutzfunktionen, indem körpereigene entartete oder fremde (z. B. von Viren und Bakterien) Proteine und Peptide in Lysosomen durch Proteasen degradiert oder durch den zytoplasmatischen Proteasom-Multiproteinkomplex zu kleinen Peptiden für die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche zur Erkennung durch das Immunsystem gespalten werden. Ferner werden Signalpeptide nach der zielgerichteten Translokation der Proteine zu den entsprechenden Zellkompartimenten, wie dem endoplasmatischen Retikulum, proteolytisch abgespalten. Zudem spielen Proteasen bei der Progression des Zellzyklus, der Zellmigration und dem programmierten Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle. Ohne an dieser Stelle weitere Beispiele aufzuführen zu wollen, weist allein die Tatsache, dass konserviert in allen Lebewesen 2 % der Strukturgene für Proteasen kodieren, auf die außerordentliche evolutionäre Bedeutung dieser Enzymklasse bei humoralen und zellulären Funktionen hin (SAKLATVALA *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den meisten enzymatischen Reaktionen sind proteolytische Spaltungen irreversibel. Daher führt eine Störung der proteolytischen Homöostase im Organismus unter Umständen zu schwerwiegenden pathologischen Folgeerscheinungen, wie sich dies z. B. bei septischen Gerinnungsstörungen infolge eines Ungleichgewichtes zwischen Proteasen und ihren regulierenden Inhibitoren zeigt. Daneben nutzen uni- und multizelluläre Parasiten wie Pilze, Bakterien und Viren auch eigene Proteasen und Protease-Inhibitoren, um sich des Wirtsorganismus für ihre Zwecke (Vermehrung) zu bedienen. Von besonderer pathologischer Bedeutung ist auch der Umstand, dass Proteine der extrazellulären Matrix (*extra cellular matrix*, ECM) sowie des Binde- und Stützgewebes durch Proteasen, die bei traumatischen Verletzungen aus Entzündungszellen oder bei der Metastasierung von Tumorzellen freigesetzt werden, unkontrolliert abgebaut werden können (RAWLINGS *et al.*, 2004). Zudem sind genetische Defekte von Onkogenen und Proteasen für die konstitutive Expression sowie für ungerichtete Über- bzw. Unterfunktionen von Proteasen mit gravierenden Folgen verantwortlich (ÜLKU *et al.*, 2003; STUMVOLL *et al.*, 2005). Deshalb werden in den einschlägigen wissenschaftlichen Disziplinen vermehrt Anstrengungen zum Verständnis der Funktionsweise und Regulation von Proteasen und deren Substrate unternommen, um zielgerichtete Therapieansätze entwickeln zu können.

Proteasen werden nach dem Reaktionstyp in Hauptgruppen (*Aspartic A*, *Cysteine C*, *Glutamic G*, *Metallo M*, *Mixed P*, *Serine S*, *Threonine T*, *Unknown U*) und nach der Strukturähnlichkeit in *Clans* bzw. entsprechend der Isoformen einer Protease in Familien eingeteilt (RAWLINGS *et al.*, 2004, <http://www.merops.ac.uk>).

Da sich die vorliegende Promotionsarbeit überwiegend mit Vertretern der Cys-Proteasen beschäftigt, konzentriert sich der folgende Überblick über den Stand der Forschung primär auf diese Hauptgruppe und im speziellen auf die Eigenschaften der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calpaine.

### B.1.1 Cysteinproteasen

Proteasen mit den Aminosäuren Cys und His in der katalytischen Dyade werden in die Gruppe der Cysteinproteasen eingeteilt (RAWLINGS *et al.*, 2004). Bei vielen Vertretern der Cysteinproteasen wurden zusätzlich zwei weitere katalytische Aminosäurereste gefunden: ein der Dyade zumeist vorstehendes Gln sowie ein meist folgendes Asn. Gln wird dabei eine Rolle bei der Bildung des sog. „Oxanion-Loches“ und Asn bei der korrekten Orientierung des Imidazolringes von His zugesprochen.

Die evolutionäre Manifestierung dieser Klasse von Proteasen zeigt sich in deren weiter Verbreitung in Viren, Bakterien, *Archaea*, Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Tieren und beim Menschen. Nach Einteilung in der MEROPS-Datenbank werden bis zum heutigen Zeitpunkt sieben *Clans* (CA, CD, CE, CF, CH, CL und C-) und 47 Familien bei den Cysteinproteasen unterschieden (RAWLINGS *et al.*, 2004).

Die meisten Cysteinproteasen sind im *Clan* CA mit 30 Familien zusammengefasst. Der Papain-Familie (*Clan* CA, Familie C1) gehören Proteasen an, die die Papain-charakteristische, zweigeteilte katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum in einer tiefen Furche (KAMPHUIS *et al.*, 1984) aufweisen. Dieser Familie sind auch die lysosomalen Cathepsine mit 11 humanen Mitgliedern (Cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, X und W) zugeordnet. Ihnen werden aufgrund von zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen (insbesondere an *knock-out* Mäusen) essentielle Beteiligungen an (patho-)physiologischen Prozessen zugeschrieben. Dementsprechend repräsentieren sie gut geeignete Angriffspunkte für die biomedizinische Forschung (TURK *et al.*, 2003). Die Familie C2 im *Clan* CA wird von den sog. Calpainen gebildet, die in den nächsten Abschnitten ausführlicher dargestellt werden. Neuerdings gewinnen auch die Mitglieder der Ubiquitin-carboxy (COOH)-terminalen Hydrolase Familie (UCH) (*Clan* CA, Familie C12) speziell für die Grundlagenforschung immer mehr an Bedeutung (WILKINSON, 2004). Als ihre biologische Funktion wird die Abspaltung einzelner Ubiquitin-Einheiten von poly-ubiquitinylierten Proteinen und Peptiden angesehen. Diese dient zum einen der Degradation durch das Proteasom mit anschließendem Ubiquitin-Recycling und zum anderen zur Unterbrechung der Ubiquitin-vermittelten Translokation zum Proteasom.

Schließlich soll an dieser Stelle im Hinblick auf essentielle Zellfunktionen von Cysteinproteasen noch hervorgehoben werden, dass in den letzten Jahren insbesondere die Beteiligung der meisten Vertreter der Caspase-Familie (*Clan* CD, Familie C14) an der Apoptose (dem „programmierten“ Zelltod) im Detail aufgedeckt wurde. Der Prozess der Apoptose wird durch *initiator*-Caspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und *executioner*-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) maßgeblich reguliert (FUENTES-PRIOR & SALVESEN, 2004; EARNSHAW *et al.*, 1999).

### B.1.2 Calpaine: $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cysteinproteasen

Der erste Bericht über das Vorkommen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, Papain-ähnlichen proteolytischen Aktivität im neutralen Bereich in einer löslichen Fraktion von Rattenhirn erschien 1964 (GUROFF, 1964). Später wurde die Bezeichnung Calpain (*calcium-dependent papain-like cysteine protease*) vorgeschlagen (MURACHI *et al.*, 1980) und in den neunziger Jahren schließlich als Fachbegriff für diese Proteasefamilie akzeptiert (SUZUKI, 1991).

Bis jetzt wurden bei Säugetieren 14 Gene aus der Familie der Calpaine (*Clan* CA, Familie C2) identifiziert, von denen bislang nur die wenigsten auf Proteinebene charakterisiert sind. Calpaine können aufgrund charakteristischer Strukturmerkmale in typische (Calpain 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 14) und untypische Calpaine (Calpain 5, 6, 7, 10, 13, 15) eingeteilt werden (GOLL *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den typischen Calpainen, die eine Calmodulin-ähnliche Domäne mit fünf sog. EF-Hand-Motiven (*penta* EF-Hand, PEF) besitzen (Abbildung B.1, B), fehlt dieses Strukturmerkmal den untypischen Vertretern dieser Familie. Das EF-Hand-Motiv kann über eine Helix–Schleife–Helix-Struktur hochaffin  $\text{Ca}^{2+}$  über sieben Sauerstoffatome koordinativ binden (sechs Sauerstoffatome stellt das Protein, ein Sauerstoffatom ein gebundenes  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül) und dadurch konformationelle Änderungen induzieren, die wesentlich zur Aktivität der Calpaine beitragen. Darüber hinaus unterscheidet man in den beiden Untergruppen ubiquitär und gewebespezifisch exprimierte Isoformen. So wird etwa Calpain 3 spezifisch im Skelettmuskel, Calpain 8 von Zellen des Magens und Calpain 9 nur im Verdauungstrakt exprimiert, während z. B. Calpain 1, 2 und 4 in allen Zellen auftreten und daher auch als ubiquitäre oder konventionelle Calpaine bezeichnet werden (GOLL *et al.*, 2003).

Die konventionellen, heterodimeren Calpaine  $\mu$ -Calpain ( $\mu$ CP) und m-Calpain (mCP) sind aus einer zu 55 – 65 % strukturhomologen, großen katalytischen Untereinheit (auch  $\mu$ 80K bzw. m80K genannt) und einer identischen kleinen regulatorischen Untereinheit (30K) aufgebaut (Abbildung B.1, B). Entsprechend der neueren Nomenklatur werden für die jeweiligen Untereinheiten der typischen Calpaine auch die Bezeichnungen Calpain 1 (CP1) für  $\mu$ 80K, Calpain 2 (CP2) für m80K und Calpain 4 (CP4) für 30K verwendet. Die Untereinheiten werden von verschiedenen Genen unabhängig voneinander kodiert: CP1 von *capn1* auf Chromosom 11q13, CP2 von *capn2* auf Chromosom 1q41-q42 und CP4 von *capn4* auf Chromosom 19q13.12 (GOLL *et al.*, 2003).

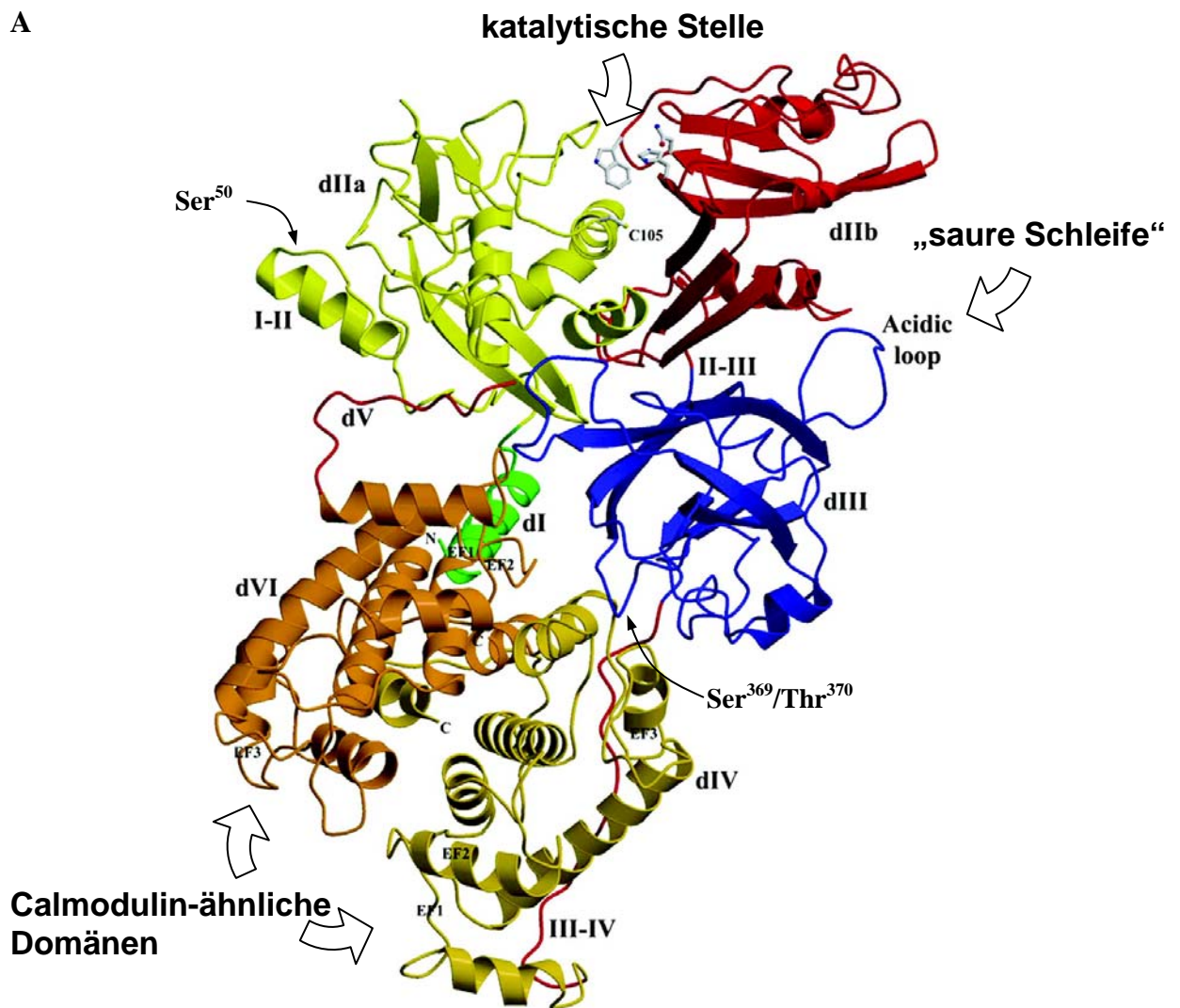
Die beiden Isoformen  $\mu$ CP und mCP, die sich hinsichtlich der benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur halbmaximalen Aktivierung *in vitro* unterscheiden ( $\mu$ CP: 3 – 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ; mCP: 400 – 800  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) zählen zu den am besten untersuchten Calpainen. Gegenwärtig können diese Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf von  $\mu$ CP und mCP auf struktureller Basis noch nicht erklärt werden (GOLL *et al.*, 2003).

Eine Dysfunktion der proteolytischen Aktivität von Calpainen infolge einer Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase oder bedingt durch genetische Mutationen äußert sich in einer Reihe von pathophysiologischen Phänomenen. So wurde etwa eine Korrelation zwischen der Sterblichkeit nach einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall und der nachweisbaren erhöhten intrazellulären Calpain-Aktivität im betroffenen Gewebe festgestellt (GOLL *et al.*, 2003). Andererseits konnte die Entstehung von *limb-girdle muscular dystrophy* Typ 2A (LGMD2A) auf Mutationen im Calpain 3-Gen mit einhergehendem Verlust der autokatalytischen Aktivität des Enzyms zurückgeführt werden (FANIN *et al.*, 2003). Ferner werden Variationen im Calpain 10-Gen in Verbindung mit Typ 2 Diabetes zurzeit intensiv diskutiert (WEEDON *et al.*, 2003).

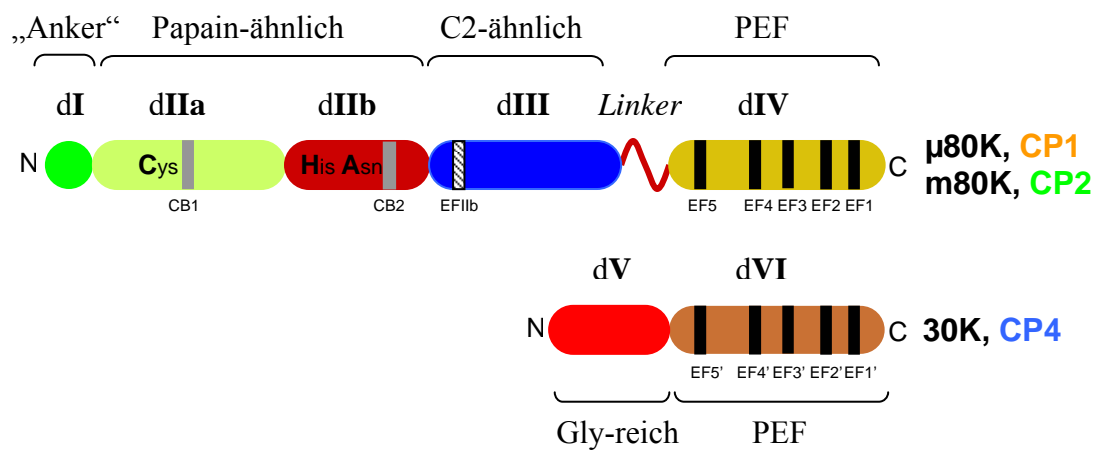
Zudem ergaben sich aus der Phänotypisierung von generierten KO-Mäusen Hinweise auf die komplexe Bedeutung der Enzymuntereinheiten bei physiologischen Prozessen, wie etwa der Embryonalentwicklung. *Capn4*<sup>-/-</sup>-Mäuseembryos, die keinerlei  $\mu$ CP- noch mCP-Aktivität besaßen, starben in der frühen embryonalen Phase (ARTHUR *et al.*, 2000). Während *Capn1*-defiziente Mäuse ausschließlich eine signifikante Verminderung der Thrombozytenaggregation aufweisen (AZAM *et al.*, 2001), scheint auch dem CP2 wichtige Aufgaben bei der Embryonalentwicklung zuzukommen, da *Capn2*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht lebensfähig sind (GOLL *et al.*, 2003).



A



B



**Abbildung B.1 Strukturmodell von Calpain.**

**A** Die „gestreckte“ Röntgenkristallstruktur des humanen mCP hat eine Dimension von 100 x 60 x 50 Å. [modifiziert nach Reverter et al. (REVERTER et al., 2001)]

**B** Schematische Darstellung der konventionellen Calpaine μCP und mCP. CB, Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle; EF, EF-Hand Motiv. Die Farbkodierung der einzelnen Domänen in A und B entsprechen einander. Ausführliche Erklärung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

### B.1.2.1 Strukturelle Eigenschaften konventioneller Calpaine

Für das Verständnis der Aktivierung und Interaktion der konventionellen Calpaine mit ihren Substraten lieferte die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Ratten-mCP (HOSFIELD *et al.*, 1999) und humanem mCP (STROBL *et al.*, 2000) initiale Hinweise. Diese Strukturanalysen bestätigten und erweiterten insbesondere die vorgeschlagene Multidomänenorganisation der großen katalytischen Untereinheit (GOLL *et al.*, 2003) (Abbildung B.1).

Demnach stellt die amino ( $\text{NH}_2$ )-terminale Domäne I (dI) ein kurzes, tief in Domäne VI (dVI) eingebettetes Polypeptid („Anker“) dar, das außer zu anderen Calpainen zu keinen weiteren Proteinen Strukturähnlichkeiten aufweist. Zudem zeigte die Analyse der Röntgenkristallstruktur für die Papain-ähnliche katalytische Domäne II die charakteristische Teilung in zwei Subdomänen (dIIa und dIIb), wobei Thiol- $\text{S}_\gamma$  ( $\text{Cys}^{105}$  in dIIa) und Imidazol- $\text{N}_\delta$  ( $\text{His}^{262}$  in dIIb) mit einem Abstand von 10,5 Å für eine funktionelle Dyade im katalytischen Zentrum zu weit voneinander entfernt sind. Für die Bildung einer funktionellen katalytischen Dyade und die Bindung von Substraten wäre eine Konformationsänderung der beiden Subdomänen dIIa und dIIb mit einer Drehung um 5° und einer Verschiebung um 1 – 2 Å erforderlich (Abbildung B.1, A). Kürzlich wurden in dIIa und dIIb je eine EF-Hand-untypische Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$  (CB1 und CB2; Abbildung B.1, B) identifiziert, die für die Aktivierung von Calpain von großer Bedeutung zu sein scheint (MOLDEVANOU *et al.*, 2002). Für die Domäne III (dIII) wurden keine Sequenzhomologien zu anderen Proteinen gefunden. Topologisch ist sie in die Gruppe der C2-Domänen (zweite konservierte Domäne von Proteinkinase C) einzuordnen. Bei vielen Proteinen ist die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an C2-Domänen für die Translokation an Membranen und für die Oligomerisierung verantwortlich. Neben Mitgliedern der Proteinkinase C (PKC)-Familie sind Phospholipase A, C und D, Synaptotagmin und die  $\text{IP}_3$  Phosphatase PTEN prominente Vertreter mit C2-Domänen (SONDERMANN & KURIYAN, 2005).

Ein interessanter struktureller Aktivierungsmechanismus wurde kürzlich durch Wechselwirkung von dIII mit der katalytischen Domäne über eine exponierte „saure Schleife“ postuliert, die die Aktivität und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf sowie die Interaktion von Membranphospholipiden mit Calpain beeinflusst (FERNANDEZ-MONTALVAN *et al.*, 2004; STROBL *et al.*, 2000). Wegen der funktionellen Verwandtschaft zu klassischen EF-Hand-Motiven wird die „saure Schleife“ als  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle daher auch als EFIIb bezeichnet. Mittels der Röntgenkristallstruktur wurde eine Domänen-unabhängige „linker“-Struktur mit 17 Aminosäuren identifiziert, die dIII und Domäne IV (dIV) miteinander verknüpft. dIV ist strukturell eindeutig der PEF-Subfamilie  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Proteine mit vier typischen (EF1, EF2, EF3 und EF4) und einer atypischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle (EF5) zuzuordnen. Dieser atypischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle wird weniger eine Funktion bei der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  als vielmehr bei der Dimerisierung mit der Domäne VI (dVI), der kleinen regulatorischen Untereinheit, zugesprochen. Wie dIV ist dVI ebenfalls ein PEF-Protein mit vier typischen (EF1', EF2', EF3' und EF4') und einer atypischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle (EF5'), die mit EF5 die Dimerisierung über hydrophobe Wechselwirkungen induziert.

Die in der Röntgenkristallstruktur nur unvollständig definierte  $\text{NH}_2$ -terminale Domäne V (dV) der 30K-Untereinheit ist infolge des hohen Gly-Anteils (40 %) sehr hydrophob. Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass diese Domäne Phospholipide (PL) binden kann (ARTHUR & CRAWFORD, 1996), die möglicherweise eine große Rolle bei der Enzymaktivierung spielen.

### B.1.2.2 Regulation der Calpain-Aktivität

Unter pathologischen Bedingungen führt die massive Aktivierung der intrazellulären Calpaine zum rapiden Abbau zahlreicher Substrate. Deshalb liegt unter physiologischen Bedingungen wohl das meiste Calpain in der Zelle in inaktiver Form vor, wobei die Aktivierung der Protease über komplexe Mechanismen reguliert zu sein scheint.

Die erstmalige Charakterisierung von mCP (DAYTON *et al.*, 1976) wies bereits auf die Bedeutung von divalenten Kationen für diesen Aktivierungsprozess hin. Jedoch übersteigt die *in vitro* benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für die halbmaximale Aktivierung sowohl von  $\mu\text{CP}$  als auch von mCP bei weitem (Faktor 1000) physiologische, im Zytosol lebender Zellen vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (50 – 300 nM). Aus diesem Grund wird intensiv nach Mechanismen gesucht, die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf beider ubiquitärer Calpaine reduzieren und dadurch eventuell die Aktivierung *in vivo* erklären könnten (Tabelle B.1). Nach heutigem Wissenstand dürfte die Aktivität von Calpainen neben der Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor allem durch den endogenen Inhibitor Calpastatin sowie wahrscheinlich auch durch die subzelluläre Lokalisation und Bindung an bestimmte Zellkompartimente bzw. durch Phosphorylierungen reguliert werden (GOLL *et al.*, 2003).

**Tabelle B.1**  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf *in vitro* für mögliche Calpain-Aktivierungsreaktionen

Mechanismus	autolysiertes $\mu\text{CP}$	$\mu\text{CP}$	autolysiertes mCP	mCP
Proteolytische Aktivität	0,5 – 2	3 – 50	50 – 150	400 – 800
Bindung an Calpastatin	0,042	40	25	250 – 500
Autolyse ohne PL <sup>*</sup>		50 – 150		550 – 800
Autolyse mit PL <sup>*</sup>		0,8 – 50		90 – 400
Aktivatorproteine		0,2		6 – 7
Phosphorylierung		n. g. <sup>**</sup>		n. g. <sup>**</sup>

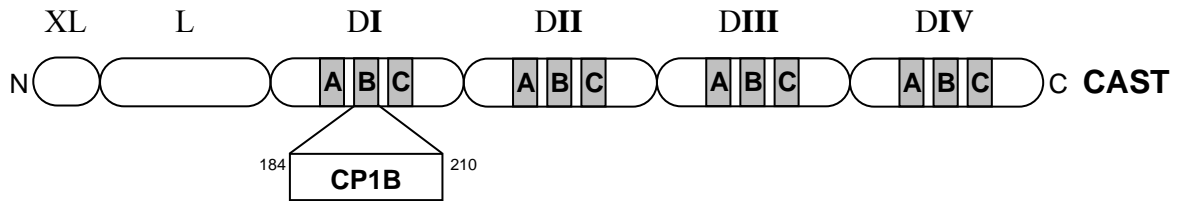
Die angegebenen Werte sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ), die für die halbmaximale Aktivität und Induktion der Autolyse benötigt werden (GOLL *et al.*, 2003). <sup>\*</sup>PL (Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat); <sup>\*\*</sup>n. g., benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurden nicht getestet, jedoch ergab die Eliminierung aller Phosphatgruppen der phospho-Ser und phospho-Thr von Calpain mit Calcineurin eine fast vollständige Inaktivierung.

#### **Calpastatin: endogener Calpain-Inhibitor**

Die Aktivität der konventionellen Calpaine  $\mu\text{CP}$  und mCP wird sehr effizient durch den endogenen Inhibitor Calpastatin (CAST) gehemmt ( $K_i < 3$  nM). Calpastatin stellt ein Polypeptid mit sechs Domänen (XL, L, DI, DII, DIII und DIV) dar, das außer  $\mu\text{CP}$  und mCP keine anderen getesteten Proteasen inhibiert (Abbildung B.2). In verschiedenen Geweben wurden  $\text{NH}_2$ -terminal verkürzte Splicevarianten des Inhibitors mit einem Molekulargewicht von 46 bis 84 kDa gefunden. Die Funktion der  $\text{NH}_2$ -terminalen Domänen XL und L, die an der Calpain-Hemmung nicht beteiligt sind, ist noch weitgehend unklar. Jede der vier inhibierenden Domänen DI, DII, DIII und DIV bindet und hemmt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die konventionellen Calpaine mit abnehmender Effizienz ( $\text{DI} > \text{DVI} > \text{DIII} > \text{DII}$ ) (MAKI *et al.*, 1987). Diese Domänen besitzen jeweils die Subdomänen A, B und C wobei A mit dIV der 80K und C mit dVI der kleinen regulatorischen Untereinheit der konventionellen Calpaine interagiert, während Subdomäne B ausschließlich zur reversiblen Inhibition der katalytischen Domäne beiträgt (Prof. Dr. Werner Machleidt, persönliche Mitteilung).

Kürzlich konnte die spezifische Hemmung von Calpainen durch ein acetyliertes 27 Aminosäuren langes Peptid der Subdomäne B von DI (CP1B, Abbildung B.2) und durch eine Variante davon, die an das zellpenetrierende 16 Aminosäuren langes Peptid der dritten Helix des homeodomänen Proteins von *Antennapedia* gekoppelt ist (PCP1B), in kultivierten Zellen gezeigt werden (GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Neuere Daten deuten darauf hin, dass sowohl die

subzelluläre Lokalisation als auch die Phosphorylierung von CAST bei der Calpain-Hemmung eine wichtige Rolle spielen (GOLL *et al.*, 2003).



**Abbildung B.2** Schematische Darstellung von Calpastatin.

Gezeigt ist die auf der Aminosäuresequenz basierende Domänenstruktur von CAST mit den Domänen XL, L, DI, DII, DIII, DIV und den Subdomänen A, B, C, sowie die Position 184 – 210 von Subdomäne B, die dem spezifischen Calpain-Inhibitor CP1B entspricht. Ausführliche Erklärung siehe Text.

### **Interaktion zwischen den Untereinheiten und Autolyse der konventionellen Calpaine**

Der Prozess der *in vitro* beobachtbaren autoproteolytischen Degradation, der sofort nach Aktivierung der konventionellen Calpaine zur Dissoziation der beiden Untereinheiten und zum Auftreten von 78 kDa und 76 kDa großen Fragmenten der 80K-Untereinheit führt (GABRIJELCIC-GEIGER *et al.*, 2001), kann den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf für die Aktivierung reduzieren (Tabelle B.1) und wird als *in vivo*-Mechanismus der Calpain-Aktivität diskutiert. Andererseits zeigten frühere Studien, dass sowohl die intakte 80K-Untereinheit (GUTTMAN *et al.*, 1997; JOHNSON & GUTTMAN, 1997) als auch eine Autolyse-defiziente Mutante (ELCE *et al.*, 1997) bereits katalytische Aktivität besitzen. Die autolytische Spaltung der großen Untereinheit führt zwar zu aktiven Fragmenten mit geringerem  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf, jedoch ist dieser, auch in Gegenwart von Phospholipiden (PL), noch signifikant größer als physiologisch auftretende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen *in vivo* (BAKI *et al.*, 1996). Wie bei *in vitro*-Studien gezeigt, steigt der Grad der Autolyse beider Calpain-Untereinheiten in Abhängigkeit von der Zeitdauer bis zum Auftreten katalytisch inaktiver Fragmente (**80K**-Untereinheit autolysiert zu Fragment mit 78 kDa → 76 kDa → 55 kDa → 40 kDa → 28 kDa → 24 kDa; **30K**-Untereinheit autolysiert zu Fragment mit 22 kDa → 18 kDa) (GABRIJELCIC-GEIGER *et al.*, 2001). Demnach könnte die Autolyse von Calpainen als irreversibler Regulationsmechanismus der proteolytischen Aktivität *in vivo* dienen. Dagegen konnte kürzlich in zellbasierten Studien mit verkürzten Calpain-Untereinheiten nachgewiesen werden, dass die exprimierten Varianten dI-IV, dI-III und dI-IIb aktiv und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig waren (GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Obendrein konnten die 80K- und 30K-Untereinheiten nach Aktivierung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin als Komplex immunopräzipitiert werden (GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Daher spielen wahrscheinlich die Autolyse und Dissoziation als Aktivierungsmechanismen der Calpaine eine geringere Rolle als bisher angenommen und müssen folglich kritisch beurteilt werden.

### **Potentielle Aktivatorproteine**

Der Beitrag der Dissoziation der 30K-Untereinheit von der großen katalytischen Untereinheit (80K) sowie der Autolyse zur Calpain-Aktivität *in vivo* ist aus den oben genannten Gründen noch nicht definitiv geklärt (GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Andererseits wurden sog. „Aktivatorproteine“ für  $\mu\text{CP}$  aus Skelettmuskel von Ratten bzw. aus Rinder- und Rattenhirn isoliert, die nicht nur die Autolyse beschleunigten, sondern auch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf für die Aktivierung von  $\mu\text{CP}$  und  $\text{mCP}$  *in vitro* senkten (MELLONI *et al.*, 1998; MICHETTI *et al.*, 1991) (Tabelle B.1). Jedoch konnte eine Interaktion mit bzw. eine Aktivierung von Calpain durch diese Proteine *in vivo* bis jetzt nicht gezeigt werden, so dass der entsprechende Mechanismus der zur Aktivierung von Calpain führen könnte, noch ungeklärt ist.

***Subzelluläre Lokalisierung: Interaktion mit Phospholipiden***

Neben einer möglichen Interaktion von „Aktivatorproteinen“ mit Calpainen zur Verringerung der für die Aktivierung und Autolyse benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden bestimmte PL, hauptsächlich Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), mit ähnlichen Funktionen entdeckt (ARTHUR & CRAWFORD, 1996). Dabei konnte jedoch nur bei einem molaren Verhältnis von 4100 : 1 ( $\text{PIP}_2$  : Calpain) eine Reduzierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarfs beobachtet werden. Bei diesen Konzentrationen bildet  $\text{PIP}_2$  Micellen, was für eine mögliche Bindung aktiver Calpaine an membranähnliche Strukturen spricht. Tatsächlich konnte in zellbasierten Studien nach einer Ionomycin-stimulierten Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der großzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie LCLC 103H die Assoziation von aktivem Calpain mit der Plasmamembran und der essentielle Beitrag der Domäne dIII bei diesem Prozess gezeigt werden (GIL-PARRADO *et al.*, 2003).

***Phosphorylierungen***

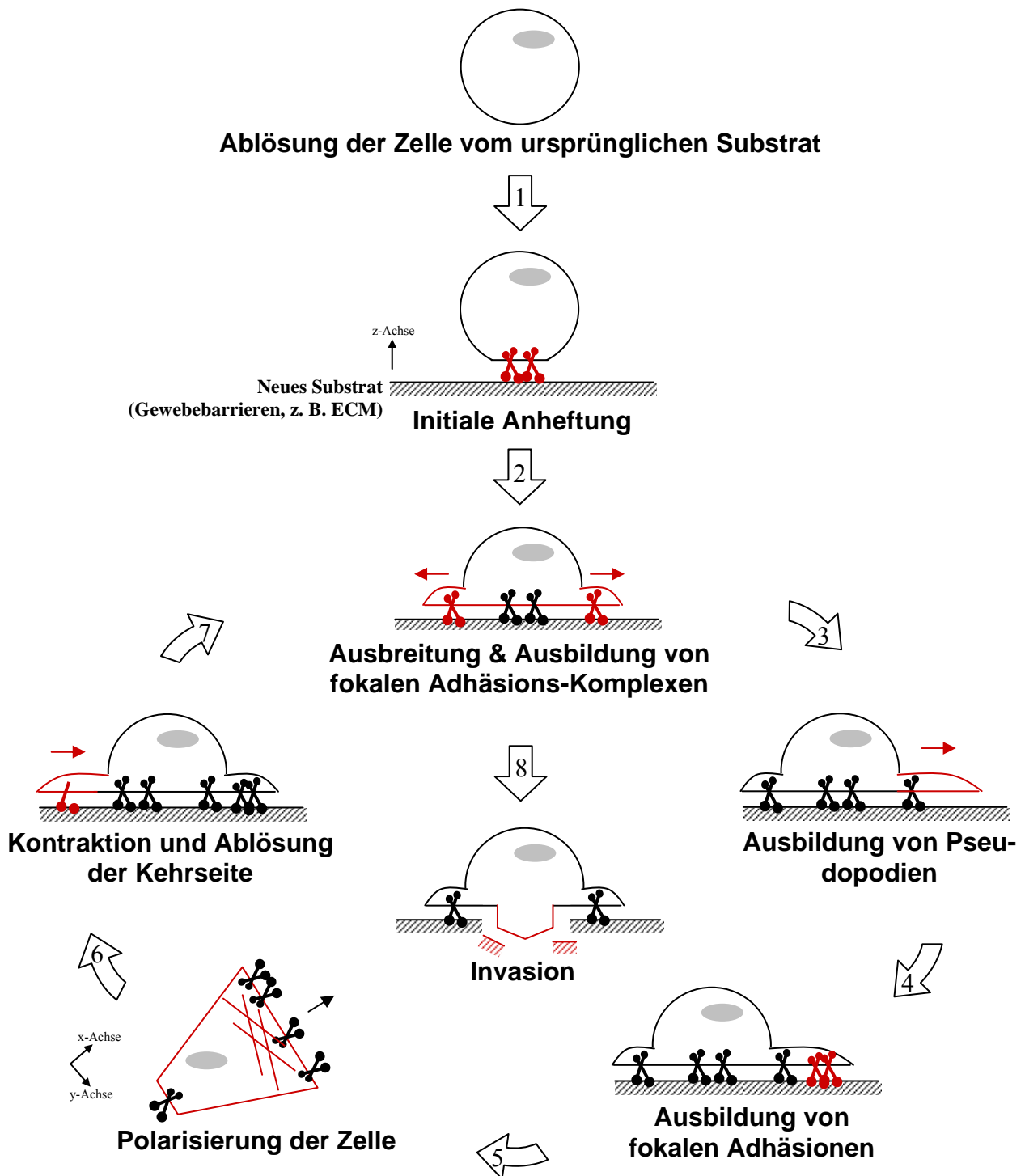
Entgegen früheren Studien, die davon ausgingen, dass Calpaine ausschließlich unphosphoryliert *in vivo* vorliegen, konnte neuerdings mittels spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierten Aminosäuren Ser, Thr und Tyr kombiniert mit massenspektrometrischen MALDI-TOF-Analysen nachgewiesen werden, dass  $\mu\text{CP}$  und  $\text{mCP}$  *in situ* an mehreren Stellen phosphoryliert sind, und zwar mit neun phosphorylierten Aminosäuren bei  $\mu\text{CP}$  und mit acht bei  $\text{mCP}$  (GOLL *et al.*, 2003). Die Elimination aller Phosphatgruppen von phospho-Ser und phospho-Thr von Calpain mit Calcineurin resultierte in einer fast vollständigen Inaktivierung der Protease (Restaktivität < 15 %), was für eine essentielle Bedeutung der Phosphorylierung für die Calpain-Aktivität spricht. Ferner wird eine potentielle Beteiligung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF und des extrazellulär-regulierten Kinase/Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (ERK/MAPK)-Signalweges bei der direkten Phosphorylierung von  $\text{mCP}$  am exponierten Ser<sup>50</sup> (Abbildung B.1, A) mittels ERK1/2 und eine daraus resultierende Aktivierung intensiv diskutiert (GLADING *et al.*, 2000). Dass eine Phosphorylierung von Calpainen jedoch nicht ausschließlich zu deren Aktivierung beitragen muss, zeigte die Inaktivierung von  $\text{mCP}$  nach Phosphorylierung von Ser<sup>369</sup> und Thr<sup>370</sup> durch die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) in Chemokin-stimulierten murinen NR6WT Fibroblasten (SHIRAHARA *et al.*, 2002). Obwohl somit Phosphorylierungsmechanismen ein wichtiger Modulator der Calpain-Aktivität zu sein scheinen, bedarf es für eine endgültige Klärung ihrer Rolle zukünftig noch weitere Analysen.

**B.2 Mechanismen der Zellmigration und -invasion**

Von den zahlreichen Funktionen, die den konventionellen Calpainen zugesprochen werden, steht die mögliche Beteiligung bei der Migration und Invasion insbesondere von Tumorzellen im Vordergrund der vorliegenden Arbeit.

Die Zellmigration ist ein sehr komplexer, räumlich und zeitlich exakt regulierter Prozess, der nahezu bei allen Zelltypen des menschlichen Organismus essentielle Aufgaben übernimmt. Die Bedeutung der Zellmigration ergibt sich aus deren Mitwirkung an einer Vielzahl (patho-)physiologischer Vorgänge, z. B. der embryonalen Morphogenese (KELLER, 2002), den Entzündungs- und Immunreaktionen (SALLUSTO & MACKAY, 2004), der Wundheilung (SANTORO & GAUDINO, 2005), der Rheumatischen Arthritis (KOCH, 2005), der Arteriosklerose (LUDEWIG & LAMAN, 2004) und der Bildung von Metastasen entarteter Zellen (ECCLES, 2005). Neuerdings gewinnt die Zellmigration auch für die Entwicklung medizinischer Technologien, wie etwa der Kolonisierung von Biomaterialien für das *tissue engineering*, an Bedeutung.

Die wesentlichen Mechanismen der Zellmigration können in acht Schritte eingeteilt werden (FRIEDL & WOLF, 2003) (Abbildung B.3), wobei die Mechanismen von Tumorzellen und nicht-neoplastischen Zellen zur Ausbreitung in nachbarschaftliches Gewebe sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch sind.



**Abbildung B.3 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Zellmigration.**

Eine frei im Blutkreislauf oder in der Lymphe „treibende“ Zelle knüpft einen ersten Kontakt zum Substrat (Schritt 1), breitet sich dort oberflächlich aus und bildet fokale Adhäsions-Komplexe (Schritt 2). Generierte Pseudopodien (Schritt 3) werden fest über fokale Adhäsionen verknüpft (Schritt 4), was zu einer Polarisierung der Zelle führt (Schritt 5). Die Kontakte der Kehrseite werden proteolytisch abgelöst, der Zellkörper wird mittels Myosin-Motoren kontrahiert (Schritt 6) und die Zelle kann wieder migrieren (Schritt 7) bzw. im Prozess der Invasion die Gewebebarriere durchbrechen (Schritt 8). Ausführliche Erklärung siehe Text.

Um migrieren zu können, muss sich der Zellkörper in seiner Form und Steifigkeit verändern und mit umgebenden Strukturen interagieren. Die Zellmigration durch Gewebe resultiert aus einem kontinuierlichen Zyklus nicht streng trennbarer, jedoch relativ unabhängiger Schritte: Eine im Blutkreislauf oder in der Lymphe „treibende“ Zelle knüpft über Adhäsionsmoleküle, wie etwa heterodimere Integrine, Kontakt zu Gewebegbarrieren, vornehmlich zu verschiedenen ECM-Proteinen (*Schritt 1*). Hierbei ermöglicht die Aktivierung von Mitgliedern der RhoA-GTPasen initiale Kontakte, in denen sich fokale Adhäsions-Proteine wie Paxillin, Ezrin und die fokale Adhäsions-Kinase (FAK) – ohne Beteiligung von Aktin – zu sog. fokalen Adhäsions-Komplexen assoziieren. Nachdem die Zelle über Adhäsionsmoleküle weitere Kontakte zum Substrat geknüpft hat (*Schritt 2*), bildet sie zylindrische, fingerähnliche Ausstülpungen, sog. Pseudopodien, aus (*Schritt 3*). Die Enden dieser Ausstülpungen verankern sich mit dem Substrat und es entstehen fokale Adhäsionen durch Integrin-vermittelte Akkumulierung von fokalen Adhäsions-Komplexen (*Schritt 4*). Anschließend kommt es durch Änderung der filamentösen F-Aktin-Verteilung von azimuthaler Symmetrie rund um den Kern zu einer Konzentrierung in definierten räumlichen Kompartimenten der Zelle, den sog. Lamellipodien, und in dessen Folge zur Ausbildung einer Zellfront. Über Initiatoren von Signalwegen, wie PKC, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der GTPase RhoA, werden fokale Adhäsions-Komplexe neu gebildet und F-Aktin-Stressfasern zu einem gelartigen Netzwerk miteinander verknüpft, was zu einer Polarisierung des Zellkörpers führt (*Schritt 5*). Die Bindung von Aktin an Myosin II zum Aktomyosin führt nach vorheriger Aktivierung durch die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Myosin-light-chain-Kinase zur Kontraktion des Zellkörpers. Diese Kontraktion wird durch die Dephosphorylierung von Aktomyosin durch die Myosin-light-chain-Phosphatase reguliert (*Schritt 6*). Gleichzeitig werden die F-Aktin-Stressfasern und fokalen Adhäsionen aufgelöst. F-Aktin-bindende und -teilende Proteine, wie Gelsolin und Cofilin, verursachen einen Strangbruch der Aktin-Filamente. Darüber hinaus werden durch Calpain intrazellulär die fokalen Adhäsionen und durch freigesetzte Proteasen extrazellulär die Bindungen von Adhäsionsmolekülen an ECM-Proteine proteolytisch gespalten (WOLF & FRIEDL, 2005). Durch zyklische Ausbildung von Lamellipodien – und folglich der Polarisierung und Kontraktion des Zellkörpers – kann die Zelle wieder über Oberflächen migrieren (*Schritt 7*). Hat sie ihren Bestimmungsort erreicht, kann die Zelle vor allem durch proteolytische Prozesse Gewebegbarrieren wie die Basalmembran und das interstitielle Stroma penetrieren (*Schritt 8*). Dieser Vorgang (Invasion) erlaubt es z. B. neoplastischen Zellen nach der Dissemination in Blut- oder Lymphgefäßen in entfernte Organe einzudringen und dort Metastasen zu bilden.

Der Prozess der Invasion wird vornehmlich durch extrazellulär lokalisierte Proteasen ermöglicht. So werden z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) in die Nähe der ECM aus diversen Zellen rekrutiert, um in deren Umgebung Proteine, vornehmlich Kollagen, Laminin, Fibronectin und Vitronectin, proteolytisch zu spalten. Durch Kollagenasen wie MMP-1 und die membrangebundene MT1-MMP (*membrane type 1-MMP*) werden native Kollagenfasern in Polypeptide und anschließend durch die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in kleinere Fragmente weiter degradiert. In der durch die extrazellulären Proteasen geschaffenen Vertiefung der Gewebegbarriere werden von der Zelle Invadopodien (Pseudopodien mit gleichzeitiger proteolytischer Degradation der ECM) und schließlich neue fokale Adhäsions-Komplexe ausgebildet, die der Zelle das fortschreitende Eindringen in das Gewebe ermöglichen. Die Invasion in das Gewebe kann die Zelle dabei aber nicht nur durch proteolytische (epithelial-mesenchymale Invasion, z. B. bei Keratinozyten), sondern auch durch nicht-proteolytische (mesenchymale-amöboide Invasion, z. B. bei T-Lymphozyten) Mechanismen erreichen (FRIEDL & WOLF, 2003).

Aufgrund der intrazellulären Lokalisation der Calpaine, dürften diese Proteasen keine direkte Rolle beim Abbau der ECM spielen, sondern vielmehr eher indirekt an Invasionsprozessen beteiligt sein.

### **B.2.1 Zellmatrix und Integrine**

Wie oben bereits angesprochen stellt die Interaktion zwischen Zellen und umliegender Matrix eine wesentliche Voraussetzung für die Zellmigration und -invasion dar.

Die Organisation von Zellen zu Zellverbänden und schließlich zu Organen wird durch den engen Kontakt der Zellen zueinander und von einem komplexen Gemisch von Makromolekülen vermittelt, die die ECM bilden. Die ECM wird von den umgebenden Zellen synthetisiert und verleiht diesen damit mechanische Stabilität im Zellverband. Durch ihre spezielle dynamische Zusammensetzung dient die ECM auch als Speicherort für lösliche Signalmoleküle, die Nachbarzellen zur Migration, Proliferation und Differenzierung anregen können (ROSSO *et al.*, 2004).

Nach der Translation und posttranslationalen Modifikation werden die ECM-Proteine in den extrazellulären Raum sezerniert und dort zu supramolekularen Strukturen polymerisiert, welche größtenteils gewebespezifisch sind (MOTT & WERB, 2004). Zu der heterogenen Population der ECM-Proteine gehören Mitglieder der großen Familie der Kollagene, Laminine, Fibronectin, Vitronectin, Nidogen, Elastin, Proteoglykane, Heparinsulfat und eine große Anzahl weiterer ECM-Komponenten (LOESER, 2000). Die Adhäsion migrierender Zellen an diese Bestandteile und deren proteolytische Degradierung bestimmen weitgehend den Prozess der Migration und Invasion insbesondere auch von Tumorzellen, weshalb nachfolgend einige wichtige ECM-Komponenten kurz dargestellt werden.

Die Familie der Kollagene stellt den größten Teil der ECM-Proteine. Dabei können die 16 verschiedenen Typen in Fibrillen-bildende (Kollagen I, II, III) und nicht-fibrilläre Kollagene (Kollagen IV, VI) eingeteilt werden. Die Besonderheit der Fibrillen-bildenden Kollagene liegt in der Produktion einer linksgängigen helikalen Struktur, wobei drei Kollagenhelices sich zu einer Tripelhelix oder Superhelix zusammenlagern. Die Mikrofibrillen bestehen aus fünf Kollagentripelhelices, die mittels elektrostatischer Wechselwirkungen und kovalenter Vernetzungen der Monomeren sehr lange Strukturen ausbilden können. Beim Auf- und Abbau dieser Kollagenstrukturen spielen, wie bereits erwähnt, vor allem Kollagenasen aus der Familie der MMPs eine entscheidende Rolle (STERNLICHT & WERB, 2001).

Das große stabförmige Glykoprotein Fibronectin erfüllt bei diversen physiologischen Prozessen, wie etwa der Gewebereparatur, Embryogenese, Hämostase, Zelladhäsion, Migration und Differenzierung wichtige Aufgaben. Fibronectin kommt in zwei Varianten vor, als unlösliches Glykoprotein-Dimer der ECM und als lösliche Disulfidverbindung des Glykoprotein-Dimers im Blutplasma. Das im Blutplasma vorhandene Fibronectin wird von Hepatozyten gebildet, während das Fibronectin der extrazellulären Matrix unter anderem von Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Makrophagen und bestimmten Epithelzellen synthetisiert wird. Die wichtigste Interaktion von Fibronectin mit zellulären Adhäsionsmolekülen vom Integrin-Typ wird über Arg-Gly-Asp (RGD)-Motive vermittelt (KAO, 1999).

Das Glykoprotein Vitronectin ist nicht nur ein Bestandteil der ECM, sondern auch des Blutplasmas und spielt sowohl bei der Zelladhäsion als auch bei der Regulation der Gerinnung eine wichtige Rolle. Strukturell und funktionell kann Vitronectin der Gruppe der Adhäsions-vermittelnden Proteine zugeordnet werden, zu denen auch Fibrinogen, Fibronectin und der von-Willebrand-Faktor zählen. Analog zu Fibronectin besitzt auch Vitronectin RGD-Motive und kann ebenso wie dieses von mehreren Integrinen gebunden werden (BUCK & HORWITZ, 1987).



Die Gruppe der heterotrimeren Laminine stellt eine der Hauptkomponenten der Basalmembran dar. Die Laminine bestehen aus den drei ähnlichen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , welche jedoch von verschiedenen Genen kodiert werden. Die 12 verschiedenen Laminin-Isoformen werden nahezu von allen epithelialen Zellen synthetisiert und übernehmen bei der Zelladhäsion, Migration und Differenzierung wichtige Aufgaben. Die typische kreuzförmige Struktur der Laminine besitzt neben globulären Enden EGF-ähnliche Wiederholungen, die für die Verbindung von Laminin mit Kollagen IV über das Protein Nidogen verantwortlich sind (HOHENESTER & ENGEL, 2002).

Beim proteolytischen Abbau der gesamten ECM- und Basalmembranproteine spielen neben den MMPs auch einige extrazellulär freigesetzte Cysteinproteasen (v. a. Cathepsin B, L und K) eine wesentliche Rolle, während die genannten Strukturproteine bisher nicht zu den bekannten Calpain-Substraten zählen. Der nachgewiesene Effekt der konventionellen Calpaine auf die Zellmigration (GLADING *et al.*, 2002) lässt daher eher einen Einfluss auf intrazelluläre Filament- und Signalproteine vermuten, die nachfolgend im Detail angeführt werden.

### B.2.1.1 Integrine als Rezeptoren für ECM-Proteine

Die wichtigsten zellulären Rezeptoren für die meisten Matrixproteine sind Mitglieder der Integrin-Superfamilie, denen bei Zellmigration und -polarität sowie Zellwachstum und Proliferation essentielle Aufgaben zukommen (BRAKEBUSCH *et al.*, 2002).

**Tabelle B.2** Die Integrin-Subfamilien und deren nachgewiesene Liganden.

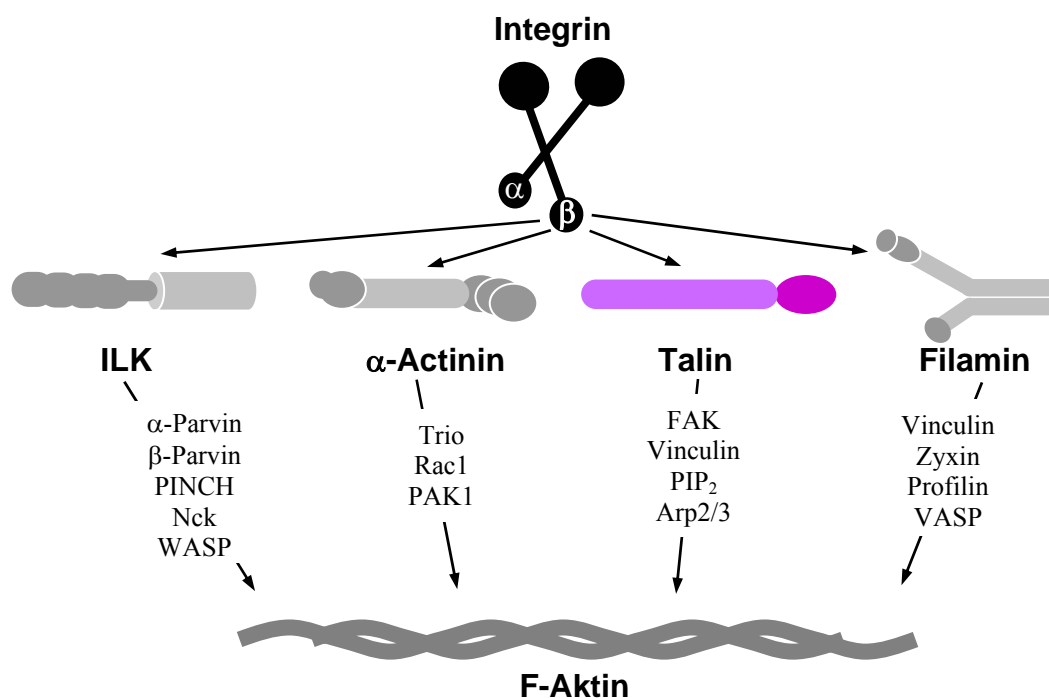
[modifiziert nach Jin und Varner (JIN & VARNER, 2004)]

Die verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erklärt.

Integrin-Rezeptor	Liganden
$\beta_1$	$\alpha_1$ Laminin, Kollagen $\alpha_2$ Laminin, Kollagen $\alpha_3$ Kollagen, Fibronectin, Laminin-1, -2/4, -5, -8, -10/11, Entactin/Nidogen, Reelin $\alpha_4$ Fibronectin, VCAM-1 $\alpha_5$ Fibronectin, L1-CAM, Fibrinogen $\alpha_6$ Laminin-1 und -5 $\alpha_7$ Laminin $\alpha_8$ Fibronectin $\alpha_9$ Tenascin $\alpha_v$ Fibronectin, Vitronectin
$\beta_2$	$\alpha_L$ ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 $\alpha_M$ Fibrinogen, Faktor X, ICAM-1, iC3b $\alpha_X$ Fibrinogen, iC3b $\alpha_D$ ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_v$	$\beta_3$ Vitronectin, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, denaturiertes Kollagen, Thrombospondin, MMP-2, Osteopontin, Del-1, BSP, Thrombin $\beta_1$ Vitronectin, Fibronectin $\beta_5$ Vitronectin, Osteopontin $\beta_6$ Fibronectin $\beta_8$ Fibronectin
	$\alpha_{IIb}\beta_3$ Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor $\alpha_4\beta_7$ VCAM, MAdCAM, Fibronectin $\alpha_E\beta_7$ E-Cadherin, LEE-CAM $\alpha_6\beta_1$ Laminin-5 $\alpha_6\beta_4$ Laminin

Integrine sind nicht-kovalent verknüpfte Heterodimere mit je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Jede dieser glykosylierten Untereinheiten besitzt einen großen extrazellulären und einen kleinen zytoplasmatischen Teil. In Säugetierzellen wurden bis jetzt 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, welche insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden können. Die spezielle Kombination der einzelnen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vermittelt die spezifische Bindung an den entsprechenden Liganden, meistens über bestimmte Peptid-Motive, wie Arg-Gly-Asp (RGD), Arg-Gly-Asp-Ser, Leu-Asp-Val und Arg-Glu-Asp-Val (KAO, 1999). Assoziiert zum Beispiel die  $\alpha_v$ - mit der  $\beta_3$ -Untereinheit, so kann das entstandene Integrin Vitronektin binden (SMITH *et al.*, 1990; SMITH & CERESH, 1990) (Tabelle B.2).

Integrine verknüpfen ECM-Proteine als Liganden mit dem filamentösen F-Aktin-Netzwerk. Die Bindung der Liganden an Integrine führt dabei zu deren Aktivierung. Aktivierte Integrine bilden Integrin-*cluster* und rekrutieren intrazellulär F-Aktin-Filamente sowie Signaltransduktionsmoleküle. Diese speziellen ECM-Bindungsstrukturen, die auch fokale Adhäsionen genannt werden, sind für die Ausbildung der Zellpolarität, die gerichtete Zellmigration und die Aufrechterhaltung von Wachstum und Proliferation von großer Bedeutung (HYNES, 2002). Die intrazellulären Bindungsproteine Integrin-*linked* Kinase (ILK),  $\alpha$ -Actinin, Talin und Filamin verbinden den zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit der Integrine mit dem F-Aktin-Netzwerk und dienen als Plattform für Signalmoleküle, die Kinasen mit deren Substrate zusammen bringen (POZZI & ZENT, 2003) (Abbildung B.4).



**Abbildung B.4** Übersicht über die verschiedenen Integrin/F-Aktin-Bindungsproteine.

Die Proteine ILK,  $\alpha$ -Actinin, Talin und Filamin verbinden die Integrine mit dem F-Aktin-Zytoskelett entweder direkt oder über die Verbindungsproteine  $\alpha$ -Parvin,  $\beta$ -Parvin, PINCH, Nck, WASP, Trio, Rac1, PAK1, FAK, Vinculin, Arp2/3, Zyxin, Profilin, VASP.

Ausführliche Erklärung und Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Talin stellt mit über 2500 Aminosäureresten ein großes, langgestrecktes Protein, das NH<sub>2</sub>-terminal eine Kopfregion (*head*) von ~ 50 kDa und einen ~ 220 kDa großen, Ala-reichen Schwanz (*rod*) aufweist. Über die sog. „four-point-one“-Ezrin-Radixin-Moesin (FERM)-

Domäne in der Kopfregion bindet Talin an den zytoplasmatischen Teil von  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrinen, an FAK, Phosphatidylinositol Phosphatkinase  $I\gamma$  (PIP $KI\gamma$ ), PIP $_2$ , Aktin,  $\alpha$ -Actinin und nicht-Integrin Transmembranrezeptoren (LI *et al.*, 2002; DI PABLO *et al.*, 2002; MARTEL *et al.*, 2001; BOROWSKY & HYNES, 1998; HEMMINGS *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1995; HORWITZ *et al.*, 1986). Bei der Bindung des Talin *head* kommt dem Asn-Pro-x-Tyr (NPxY)-Motiv im zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit von Integrinen eine wichtige Rolle zu (VIGNOUD *et al.*, 1997). Die *rod*-Domäne besitzt dagegen nur eine schwache Affinität für Integrine (YAN *et al.*, 2002), jedoch zwei der drei Bindungsstellen für Vinculin und die Hauptbindungsstelle für Aktin am COOH-Terminus (HEMMINGS *et al.*, 1996). Die Bindung von Talin an Integrine löst eine intrazelluläre Salzbrücke zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit und erhöht dadurch die *cluster*-Bildung und Affinität zu Liganden (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2003). PIP $_2$  verstärkt die Bindung von Talin an Integrine (MARTEL *et al.*, 2001), was wiederum die Assoziation und Aktivierung des PIP $_2$ -bildenden Enzyms PIP $KI\gamma$  zur Folge hat (DI PAOLO *et al.*, 2002). Dies führt zu einer erhöhten lokalen Konzentration von PIP $_2$  und unterstützt dadurch die Bindung von Talin und anderen Proteinen in fokalen Adhäsionen. Die Assoziation von Talin mit Vinculin, einem ubiquitären Zytoskelettprotein bei Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakten, ist ebenfalls PIP $_2$ -abhängig. Durch die Rekrutierung des Aktin-related Protein 2/3 (Arp2/3)-Komplexes durch Vinculin kann die Aktin-Nukleusbildung initiiert werden, was schließlich neue F-Aktin-Netzwerke für das Fortschreiten der Lamellipodien-Front generiert (DEMALI *et al.*, 2002).

Nach der Bindung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Parvin, PINCH, dem Src-Homologie-Domäne 2/3 (SH2/SH3)-Adaptorprotein Nck und dem Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) an die ILK kann diese unter anderem PKB/Akt und GSK-3 $\beta$  phosphorylieren und so die Integrin-vermittelte Zellproliferation und das anheftungsbedingte Überleben von Zellen regulieren. GSK-3 $\beta$  als Negativregulator des Wnt-Signalweges (FRAME & COHEN, 2001) ermöglicht nach dessen Phosphorylierung die Stabilisierung und Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus. Die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren Lef1/Tcf aktiviert auch die Transkription von Cyclin D1 und c-myc. Die Ser/Thr Kinase PKB/Akt ist demnach an der Zellproliferation beteiligt, und es wird vermutet, dass die zur Aktivierung nötige Phosphorylierung an Ser<sup>473</sup> durch ILK katalysiert wird (PERSAD *et al.*, 2001).

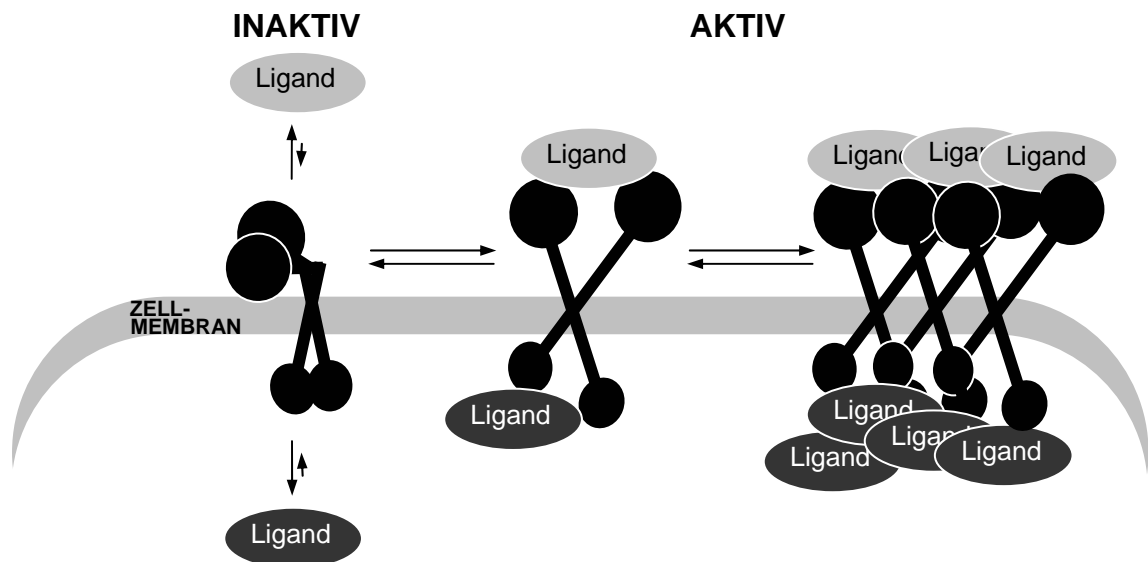
Durch  $\alpha$ -Actinin werden Aktin-Fibrillen mit Transmembranrezeptoren (Adhäsionsmolekülen) wie Integrine, Cadherine und ICAMs verbunden und darüber hinaus Aktin-Bündel und -Netzwerke verknüpft. Die Aktin-Bindungsstelle ist am NH $_2$ -Terminus lokalisiert, während der COOH-Terminus mit ein bis zwei EF Hand-Motiven Ca<sup>2+</sup> komplexieren und so die Interaktion von Aktin mit nicht-muskulären  $\alpha$ -Actinin negativ regulieren kann (WITKE *et al.*, 1993). Neben zahlreichen zytoplasmatischen Proteinen interagiert  $\alpha$ -Actinin auch mit Vinculin, Zyxin, ERK1/2, Mitogen-aktivierte Protein/extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase 1 (MEKK1), Protein Kinase N und der p85-Untereinheit von PI3K. Diese Assoziation deutet auf  $\alpha$ -Actinin als wichtiges Regulationsprotein hin (LEINWEBER *et al.*, 1999; CHRISTERSON *et al.*, 1999; MUKAI *et al.*, 1997; SHIBASAKI *et al.*, 1994; CRAWFORD *et al.*, 1992; WACHSSTOCK *et al.*, 1987).

Filamin ist ein dimeres Protein mit einer Kopfregion, die die Aktin-Bindungsstelle beinhaltet, und einer Schwanzdomäne mit 4 bis 24 repetitiven Immunglobulin-ähnlichen Einheiten (STOSSEL *et al.*, 2001). Die beiden Untereinheiten sind nicht-kovalent am COOH-Terminus assoziiert. Die drei humanen Filamin-Gene für Filamin A, B und C können durch alternatives *splicing* eine Vielzahl von Isoformen generieren. Während Filamin A und B ubiquitär expriert werden, findet man Filamin C hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel. Über die verschiedenen repetitiven Motive in der Schwanzregion bindet Filamin Transmembranproteine wie Integrine (LOO *et al.*, 1998), Signaltransduktionsmoleküle aus der RhoA-Familie (OHTA *et al.*, 1999), *stress-activated* Proteinkinase (MARTI *et al.*, 1997) und Guanidin Nukleotid ex-

*change* Faktoren (GEFs) (BELLANGER *et al.*, 2000). Der GEF Trio, der für die Aktivierung von Rac1, RhoA und RhoG verantwortlich ist, kann an Filamin binden und damit die Reaktion von Filamin-gebundenem inaktiven GDP-Rac1 zu aktivem GTP-Rac1 katalysieren (BELLANGER *et al.*, 2000). Infolge dessen ist GTP-Rac1 in der Lage, die Effektor kinase p21-*activated kinase* (PAK) 1 zu aktivieren, die wiederum für die Reorganisation des F-Aktin-Zytoskeletts von großer Bedeutung ist (VADLAMUDI *et al.*, 2002).

### B.2.1.2 Integrine als bidirektionale Signalmoleküle

Die Eigenschaft von Integrinen Signale von außen in das Zellinnere (*outside-in*) oder aus dem Inneren der Zelle in den extrazellulären Raum (*inside-out*) zu vermitteln, wird als bidirektionale Signalleitung der Integrine bezeichnet. Hierbei ist der inaktive Zustand der Integrine durch die geringe Affinität der extrazellulären Domänen zu Liganden und durch die Assoziation der zytoplasmatischen Bereiche der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit charakterisiert. In diesem assoziierten Zustand zeigen intrazelluläre Signal- und Zytoskelettproteine nur eine geringe Neigung zur Interaktion mit Integrinen. Die Analyse der Röntgenkristallstruktur von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und Struktur-basierte Modelle lieferten Hinweise zum Liganden-vermittelten Aktivierungsmechanismus dieser Rezeptormoleküle (XIONG *et al.*, 2001). Sowohl die Assoziation von Liganden mit der NH<sub>2</sub>-terminalen extrazellulären Bindungsdomäne als auch die Anlagerung von Proteinen an die zytoplasmatischen COOH-Termini haben bedeutende konformationelle Änderungen der Raumstruktur zur Folge (EMSLEY *et al.*, 2000): Einerseits wird das inaktive, kompakt-globuläre Heterodimer zu einer langgestreckten Struktur „ausgeklappt“ und andererseits die durch eine Salzbrücke vermittelte Interaktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten im Zytoplasma aufgelöst, was zu einer Dissoziation der beiden COOH-Termini führt. In diesem Zustand ist die Affinität von Liganden zu der extrazellulären Bindungsdomäne und den zytoplasmatischen Motiven stark erhöht (Abbildung B.5).



**Abbildung B.5 Modell der bidirektionalen Signalübertragung der Integrine.**

[modifiziert nach Xiong *et al.* (XIONG *et al.*, 2001)]

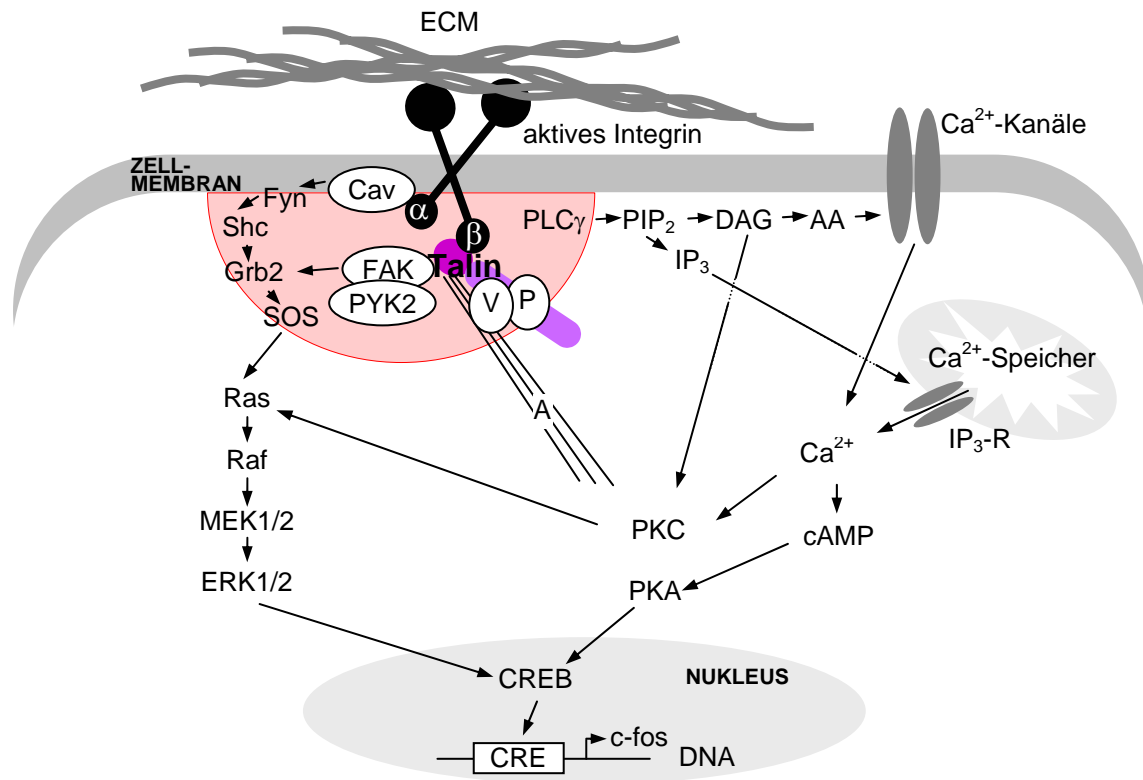
Im inaktiven Zustand haben Liganden eine geringe Affinität, im aktiven Zustand eine hohe Affinität, an die extrazelluläre Bindungsstelle (grau, extrazelluläre Liganden; dunkelgrau, zytoplasmatische Liganden) oder die zytoplasmatischen Motive zu binden. Aktive Integrine können akkumulieren und fokale Adhäsionen bilden. Alle Zustände sind reversibel.

Neben der Ausbildung der ersten initialen Kontakte der Zelle zu anderen Zellen oder zur ECM reguliert die *inside-out*-Signalübertragung eine übermäßige Integrin-vermittelte Zelladhäsion, die etwa eine spontane Aggregation von Blutzellen und weitere pathologische Konsequenzen zur Folge haben könnte. Dagegen wird die feste Bindung an die ECM durch die *outside-in*-Signalübertragung reguliert. Die Bindung von extrazellulären ECM-Liganden an aktive Integrine induziert die *cluster*-Bildung dieser Rezeptoren und die damit verbundene Ausbildung von stabilen fokalen Adhäsionen aus anfänglichen labilen fokalen Adhäsions-Komplexen, wodurch die initialen Verknüpfungen zum F-Aktin-Zytoskelett gefestigt werden (Abbildung B.5). Darüber hinaus akkumulieren an den fokalen Adhäsionen hohe lokale Konzentrationen von Signalmolekülen, wie FAK, Pro-reiche Tyr-Kinase (PYK) 2, Src und Fyn, die dann über komplexe intrazelluläre Signalnetzwerke Prozesse wie die Zellmigration, das Wachstum und die Differenzierung regulieren (WOZNIAK *et al.*, 2004).

Durch diese Integrin-vermittelte lokale Akkumulation von Signalmolekülen in den fokalen Adhäsionen kann eine Vielzahl von Signalübertragungen induziert werden (LEE & JULIANO, 2004; HYNES, 2002). So werden Integrin-abhängig die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Tyr- und Ser/Thr-Phosphorylierungen, der Inositol-Lipid-Metabolismus und die Aktivität der RhoA-Familienmitglieder moduliert (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; DANEN & YAMADA, 2001; SCHWARTZ, 2001; ARTHUR *et al.*, 2002).

Abgesehen von einem *crosstalk* zwischen Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, deren Aktivierung in der Phosphorylierung von assoziierten Signalproteinen resultiert, können diese auch unabhängig voneinander eine transiente Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges bewirken (RENSHAW *et al.*, 1999). Diese Aktivierung kann FAK-abhängig und -unabhängig verlaufen. Bei der FAK-vermittelten Aktivierung wird durch die *cluster*-Bildung von Integrinen und durch die Ausbildung von fokalen Adhäsionen die Rekrutierung und Dimerisierung von FAK induziert (LIPFERT *et al.*, 1992). Die Aktivierung von FAK führt zu dessen Autophosphorylierung an Tyr<sup>397</sup> und somit zu einer Bindungsstelle für Mitglieder der Src-Kinasen. Durch die Phosphorylierung von FAK an Tyr<sup>925</sup> durch c-Src entstehen Bindungsstellen für SH2-tragende Proteine, wie etwa das SH2-SH3 Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor bound 2*). Das Adapterprotein Grb2 koppelt FAK über SOS (*son-of-sevenless*), ein Ras-GEF, an den ERK/MAPK-Signalweg, was nach der Aktivierung und Rekrutierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cyclic-AMP responsive element binding*) zur Expression von c-fos führt (SONG *et al.*, 2005).

Die FAK-unabhängige Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges läuft dagegen über die Assoziation der  $\alpha$ -Untereinheiten von aktivierten Integrinen ( $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$ ) mit dem kleinen Membranprotein Caveolin. Durch diese Interaktion werden Fyn und Shc an die fokalen Adhäsionen rekrutiert und phosphoryliert, was wiederum in einer Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade resultiert. Eine weitere Komponente Integrin-induzierter fokaler Adhäsionen ist die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) aus PIP<sub>2</sub> katalysiert (HUGHES & PUTNEY, 1988). IP<sub>3</sub> induziert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Zytosol aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum, während Arachidonsäure (AA) für die Öffnung von transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen verantwortlich ist. Infolge dessen können  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG die Mitglieder der konventionellen PKC (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II und PKC $\gamma$ ) aktivieren (Abbildung B.6).



**Abbildung B.6 Modell der Integrin-vermittelten Mechanismen bei der ERK/MAPK-Signaltransduktion.**

[modifiziert nach Song et al. und Renshaw et al. (SONG et al., 2005; RENSHAW et al., 1999)]

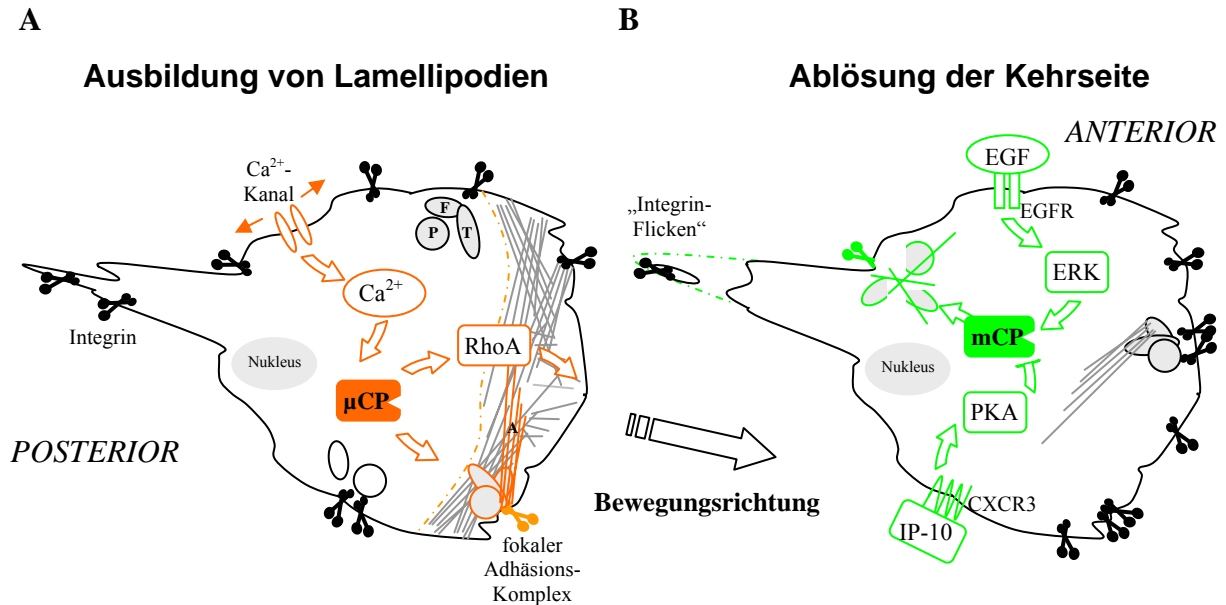
Integrin-vermittelte fokale Adhäsionen (roter Halbkreis) dienen als Plattform für eine Vielzahl von Signaltransduktionsproteinen. Cav, Caveolin; V, Vinculin; P, Paxilin; A, Aktin-Stressfasern; IP<sub>3</sub>-R, IP<sub>3</sub>-Rezeptor. Ausführliche Erklärung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Im nächsten Abschnitt sollen nun wesentliche Erkenntnisse über die potentielle Rolle der konventionellen Calpaine bei der Integrin-vermittelten Signaltransduktion sowie Regulationsmechanismen der MMPs im Rahmen von Zellmigration und -invasion zusammengefasst werden.

### B.3 Zur Rolle der konventionellen Calpaine und MMP-Regulationsmechanismen bei der Zellmigration

Neben den zellulären Prozessen, die z. B. den Proteinstoffwechsel, die Proliferation oder die Apoptose betreffen, kommt den konventionellen Calpainen  $\mu$ CP und mCP auch bei der Zelladhäsion und -migration eine essentielle Rolle zu. Kürzlich konnte bei CP4-defizienten embryonalen murinen Fibroblasten, bei denen für beide Isoformen keine Calpain-Aktivität nachweisbar war, eine signifikante Verminderung der Fibronektin-stimulierten Migration sowie ein missgebildetes Aktin-Zytoskelett gefunden werden (DOURDIN *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde in mehreren zellbasierten Migrationsstudien durch den Einsatz von Calpain-Inhibitoren die Bedeutung von Calpainen bei diesen Prozessen offenkundig (LOKUTA *et al.*, 2003; MAMOUNE *et al.*, 2003; KASSIS *et al.*, 2002). Der Mechanismus, wie und in welchem Maße Calpaine die Migration beeinflussen, blieb jedoch ungeklärt.

Aktuelle Vorstellungen über die Beeinflussung der Zellmigration durch Calpain wurden auch von Glading *et al.* im isoformspezifischen „Fronten-Modell“ beschrieben (GLADING *et al.*, 2002) (siehe Abbildung B.7). Diese Ergebnisse beruhen ebenfalls auf zellbasierten Studien in Verbindung mit dem Einsatz unterschiedlicher Calpain-Inhibitoren.



**Abbildung B.7** Mögliche Calpain-vermittelte Mechanismen bei der Zellmigration.

[modifiziert nach Glading et al. (GLADING et al., 2002)]

**A** Modell zur Ausbildung von Lamellipodien durch  $\mu\text{CP}$ : Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert  $\mu\text{CP}$ , das einerseits durch Aktivierung von RhoA-GTPasen die Bildung von Lamellipodien induziert und andererseits durch Proteolyse der fokalen Adhäsions-Komplexe die Neubildung von Zell/ECM-Kontakten an der Anterior-Kontaktseite der Zelle ermöglicht.

P, Paxilin; T, Talin; F, fokale Adhäsions-Kinase; A, Aktin-Bündel.

**B** Modell zur Ablösung der Zellenkehrseite durch mCP: Wachstumsfaktoren wie EGF aktivieren über die Bindung an EGFR den ERK/MAPK-Signalweg und in Folge mCP, das an der Posterior-Seite fokale Adhäsionen auflöst. Die IP-10-vermittelte Aktivierung von PKA führt zur inhibitorischen Phosphorylierung von mCP.

Ausführliche Erklärung und Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Im „Fronten-Modell“ wird  $\mu\text{CP}$  als Initiator für die Ausbildung von Lamellipodien und somit der Polarisation der Zelle durch indirekte Aktivierung kleiner GTPasen der RhoA-Familie an der Anterior-Seite verantwortlich gemacht. Mechanische und/oder Integrin-vermittelte Signale sollen ein Einfließen von  $\text{Ca}^{2+}$  durch spezifische Ionenkanäle ermöglichen und somit die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhen. Als Folge davon wird  $\mu\text{CP}$  aktiviert, das dann die Zielproteine Talin, Ezrin, FAK sowie die zytoplasmatischen Domänen von Integrin  $\beta 1$  und  $\beta 3$  spaltet, wodurch der Abbau alter und die Formation neuer fokaler Adhäsionen an der Zellvorderseite ermöglicht wird (siehe Abbildung B.7, A).

Die durch Wachstumsfaktoren wie EGF induzierte und an die Zellmembran rekrutierte proteolytische Aktivität von mCP soll nach dem „Fronten-Modell“ vornehmlich fokale Adhäsions-Komplexe abbauen und damit den Kontakt der Zelle mit dem Substrat an der Posterior-Seite auflösen. Die Lokalisierung von mCP an Membranstrukturen und somit auch an fokalen Adhäsions-Komplexen wird über PL-Bindung hervorgerufen. Die Spaltung der Zell-Substrat-Kontakte bewirkt die Freisetzung von Integrinen, die einerseits in endozytotischen Recycling-Prozessen an der Zellfront für die Bildung neuer fokaler Adhäsionen eingesetzt werden und andererseits eine Spur von Membranbruchstücken mit assoziierten Integrinen („Integrin-Flicker“) hinter der migrierenden Zelle erzeugen. Die Bindung des Chemokins IP-10 an den Chemokinrezeptor CXCR3 der CXCR-Subfamilie aktiviert über die Adenylatcyclase-cAMP-Kaskade die PKA, die wiederum die Zellmigration durch inhibitorische Phosphorylierung von mCP reguliert (Abbildung B.7, B). Im „Fronten-Modell“ wird die Wirksamkeit der beiden Calpain-Isoformen  $\mu\text{CP}$  und mCP weniger ihrer Substratspezifität als einer intensiven räumlichen und zeitlichen Regulierung bei der Zellmigration zugeschrieben (GLADING et al., 2002).

Bei den Integrin-vermittelten Regulationsmechanismen kommt der proteolytischen Degradierung von Adhäsionskomplexen eine essentielle Bedeutung für die Zellmigration zu (CARRAGHER & FRAME, 2003). Zu den bisher *in vivo* identifizierten potentiellen Calpain-Substraten zählen eine Vielzahl von Proteinen, die wie bereits erwähnt, mit der Zelladhäsion und -migration in Verbindung gebracht werden: EGFR, Talin, Ezrin, Paxilin, Vinculin,  $\alpha$ -Actinin, Integrin  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4, Tau, FAK, pp60src, PKC sowie RhoA (GLADING *et al.*, 2002). Beim komplexen Prozess der Zellmigration dürfte die (limitierte) Spaltung solcher intrazellulären Substrate durch Calpaine einer räumlich und wahrscheinlich auch zeitlich begrenzten Regulierung unterliegen. Bislang ist jedoch unklar, ob die Proteolyse eines oder mehrerer solcher Substrate notwendig bzw. ausreichend ist, um die Verbindung von Integrinen mit dem Substrat zu lösen und/oder die Bildung von Lamellipodien durch Aktivierung von GTPasen zu induzieren, um so letztendlich die Zellmigration zu ermöglichen (Abbildung B.7). Dazu kommt, dass die Computer-unterstützte Identifizierung von Calpain-Substraten dadurch erschwert wird, dass Calpaine bekanntermaßen keine spezifische Spaltungssequenz erkennen (TOMPA *et al.* 2004), sondern vielmehr Substrate über sog. *exosites* mittels räumliche ausgedehnter Oberflächenkontakten erfassen.

Somit ist die Beteiligung von Calpain und insbesondere der Beitrag der einzelnen Isoformen  $\mu$ CP und mCP bei Prozessen der Zellmigration bislang nur in Ansätzen verstanden. Bei Gebrauch von Calpain-Inhibitoren für die Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie der Zellmigration wurde zudem durch die gleichzeitige Hemmung beider Isoformen die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Zur Aufklärung der Calpain-vermittelten Mechanismen bei der Migration sind daher zellbasierte Systeme erforderlich, die es erlauben, den Einfluss beider Isoformen sowohl getrennt als auch in Kombination miteinander zu untersuchen. So könnten für die Analyse der isoformspezifischen Beteiligung von Calpain bei der Zellmigration die Aktivitäten von  $\mu$ CP und mCP indirekt mittels zweier post-transkriptionaler Mechanismen der Genrepression, nämlich der *antisense*-Strategie (AS; CROOKE, 2004) und der RNA Interferenz (RNAi; FIRE *et al.*, 1998), reguliert werden.

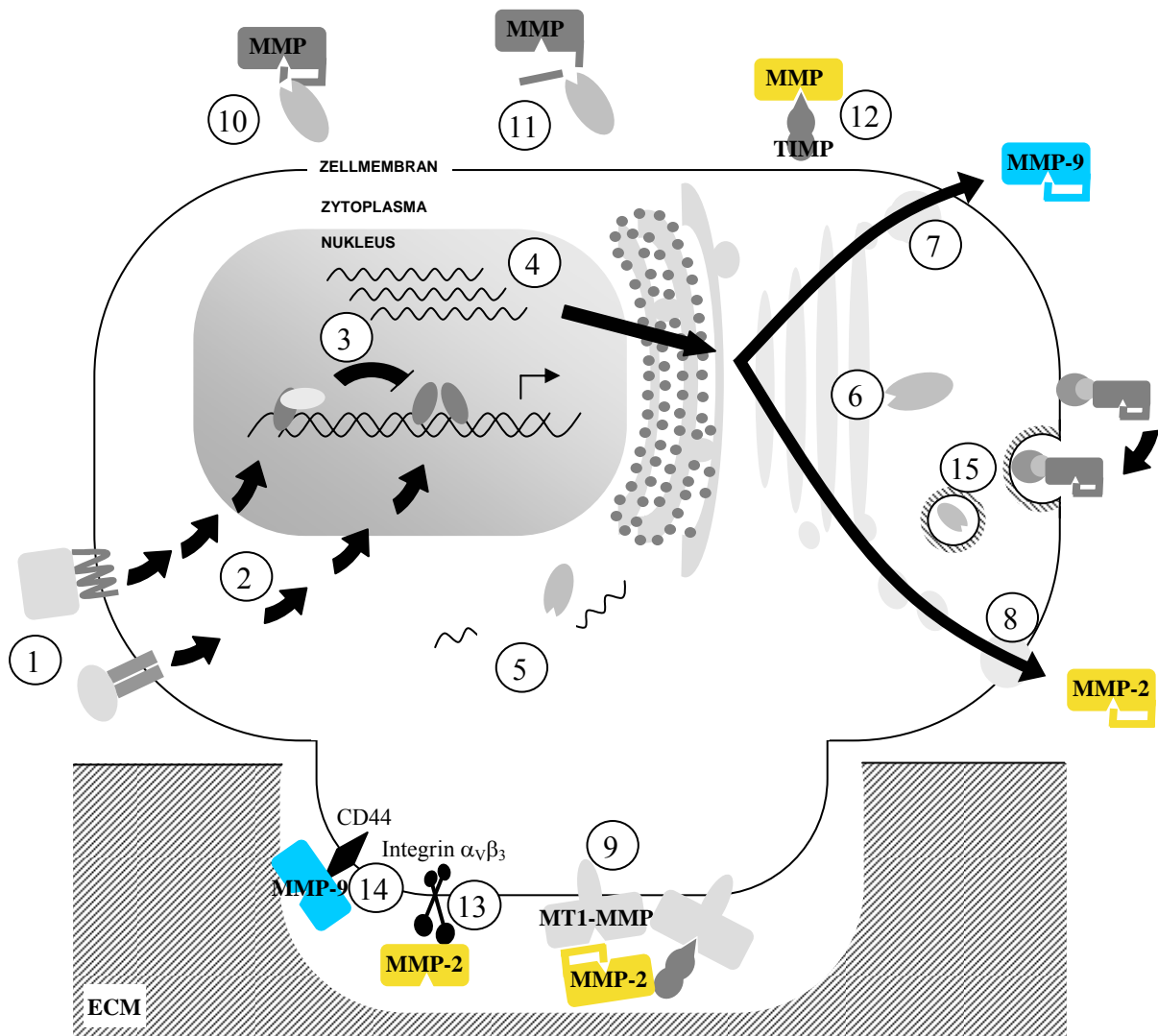
Aufgrund der intrazellulären Lokalisation der Calpaine dürfte die Degradierung von ECM-Proteinen durch extrazellulär wirksame Proteasen wie z. B. MMPs essentiell für die epidermal-mesenchymale Invasion von Zellen in Geweben sein (FRIEDL & WOLF, 2003), weshalb nachfolgend kurz wesentliche Regulationsmechanismen der MMPs aufgeführt werden sollen.

Die Regulation der Expression und Aktivität von MMPs kann prinzipiell in transkriptionelle, post-transkriptionelle, post-translationale und funktionelle Mechanismen eingeteilt werden (STERNLICHT & WERB, 2001). So können MMPs reguliert werden durch (Abbildung B.8):

- 1) induzierende und suppressive Signale (BAUER *et al.*, 2005),
- 2) intrazelluläre Signaltransduktionswege (JINNIN *et al.*, 2005),
- 3) transkriptionelle Aktivierung und Repression (BENBOW & BRINCKERHOFF, 1997),
- 4) post-transkriptionelle mRNA-Prozessierung (LUO *et al.*, 2002),
- 5) mRNA-Degradierung (KANOMATA *et al.*, 2005),
- 6) intrazelluläre Aktivierung Furin-hydrolysesensitiver MMPs (CAO *et al.*, 2005),
- 7) regulierte Sekretion (CIBOROWSKI *et al.*, 2004)
- 8) konstitutive Sekretion (SCHNAEKER *et al.*, 2004),
- 9) Zellmembran-lokalisierte Aktivierung (NAGASE, 1998),
- 10) extrazelluläre proteolytische Aktivierung (LINDSTAD *et al.*, 2005),
- 11) Inaktivierung durch proteolytische Prozessierung (KREMER *et al.*, 1998),
- 12) Assoziation mit „Integrin-Rezeptoren“ (DERYUGINA *et al.*, 2001),
- 15) Endozytose und intrazellulären Abbau (OSENKOWSKI *et al.*, 2004).



In diesem Kontext sind die Regulationsmechanismen der beiden Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) von besonderem Interesse (Abbildung 8: 9, 13, 14). Man nimmt heute an, dass MMP-2 konstitutiv sekretiert und die Freisetzung von MMP-9 durch induktive Signale gesteuert wird. Darüber hinaus können MMP-2 und -9 in membrangebundener Form – MMP-2 an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (DERYUGINA *et al.*, 2001) und MMP-9 an CD44 (MURRAY *et al.*, 2004) – die ECM-Proteine (hauptsächlich Kollagen IV, Fibronektin und Vitronektin) proteolytisch spalten. Neben der Aktivierung von MMP-2 im extrazellulären Raum kann die Aktivierung des Zymogens zudem durch die membranständige Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP nach vorheriger Bindung von ProMMP-2 über den endogenen Inhibitor TIMP-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) an eine weitere MT1-MMP erfolgen (DERYUGINA *et al.*, 2001).



**Abbildung B.8 Modell der verschiedenen MMP-Regulationsmechanismen.**

[modifiziert und erweitert nach Sternlicht und Werb (STERNLICHT & WERB, 2001)]

Von besonderer Bedeutung sind die Regulationsmechanismen der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 bei der Invasion von Zellen.

Ausführliche Erklärung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Interessanterweise wurde kürzlich bei der Analyse von immortalisierten CP4-KO-Fibroblasten, eine Korrelation zwischen der Calpain-Aktivität und der mRNA-Expression von MMP-2 nachgewiesen (POSTOVIT *et al.*, 2002). Eine Erklärung für diese Korrelation ist jedoch noch nicht bekannt und sollte in der vorliegenden Promotionsarbeit anhand von Untersuchungen diverser Zelllinien ermöglicht werden.

## B.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ausgehend vom Stand der Forschung zu Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit erschienen folgende offene Fragen von vorrangiger Bedeutung:

- Sind Calpaine isoformspezifisch an verschiedenen Zellfunktionen insbesondere der Zellmigration beteiligt?
- Wird die Zellmigration durch potentiell isoformspezifische intrazelluläre Calpain-Substrate beeinflusst?
- Sind Calpaine an der über spezifische Signaltransduktionsmechanismen regulierten MMP-Expression während der Zellmigration beteiligt?

Die Klärung dieser Fragestellungen sollte am Beispiel verschiedener Tumorzelllinien (HeLa- und THP-1-Zellen) durch drei wesentliche Zielsetzungen erreicht werden.

### B.4.1 Zielsetzung 1: *Down-Regulation von isoformspezifischen Calpain-Proteinen in verschiedenen Zellsystemen und Analyse diverser Zellfunktionen*

Zum Nachweis der isoformspezifischen Beteiligung von konventionellen Calpainen an diversen Zellfunktionen schien die differentielle *down*-Regulation der Aktivitäten von  $\mu$ CP und mCP mittels AS-Strategie bzw. RNAi als Methode der Wahl, da bisherige Calpain-Inhibitoren keine isoformspezifische Unterscheidung erlauben.

In diesem Zusammenhang sollte nun eine eingehende Charakterisierung von im Labor verfügbaren HeLa-AS-Zelllinien gegen CP1 (*capn1AS*) und CP2 (*capn2AS*) (TANNENBERG, 2000) hinsichtlich

- der Expression des Calpain-Systems in Assoziation zu
- dem Proliferationsvermögen,
- der Apoptoseempfindlichkeit,
- der Zellzyklusprogression,
- des cDNA-Profiles von Signaltransduktionsproteinen und assoziierten Genprodukten sowie insbesondere
- des Migrationsverhaltens

durchgeführt werden. Um zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die *down*-Regulation der entsprechenden Calpaine zurückzuführen sind, sollte in diesen Zellen die  $\mu$ CP- bzw. mCP-Expression exemplarisch auch wieder mittels gentechnologischer Verfahren rekonstituiert werden.

Zur flexiblen Regulierung der Genexpression von Vertretern des Calpain-Systems sowie weiterer relevanter Zielgene sollten darüber hinaus Plasmid-basierte RNAi-Systeme entwickelt und etabliert werden. Ausgehend von Datenbankrecherchen sollten dafür potentielle Zielsequenzen für die RNAi ausgewählt und deren Effizienz mittels synthetisierter siRNAs in zellbasierten Analysen bestimmt werden. Anschließend sollten diese Sequenzen über geeignete Verfahren in diverse, eigens hergestellte, Plasmid-basierte RNAi-Systeme eingebracht und analysiert werden. Hierbei war die detaillierte Aufklärung der Beteiligung einzelner Calpain-Untereinheiten sowie von Kombinationen davon in Zellmigrationsstudien von vorrangiger Bedeutung.

### **B.4.2 Zielsetzung 2: Identifizierung von potentiell isoformspezifischen Calpain-Substraten bei der Zellmigration**

Unter Verwendung der AS- und RNAi-Strategie sollten in zellbasierten Studien potentiell isoformspezifische Interaktionspartner und Substrate von  $\mu$ CP bzw. mCP identifiziert werden, wobei der Fokus primär auf Komponenten des fokalen Adhäsions-Komplexes und assoziierter Signaltransduktionsmoleküle gelegt werden sollte.

Sollten relevante Interaktionspartner oder Substrate identifiziert werden, war geplant, entsprechende Varianten herzustellen, die Calpainolyse-sensitiv oder -resistent sind. Anschließend sollte die Rolle dieser Varianten bei der Zellmigration analysiert werden.

### **B.4.3 Zielsetzung 3: Untersuchung der Calpain-Beteiligung bei Signaltransduktionsmechanismen der MMP-Expression**

Basierend auf ersten Beobachtungen an immortalisierten CP4-KO-Fibroblasten, die eine Korrelation der mRNA-Expression von MMP-2 mit der intrazellulären Calpain-Aktivität zeigten (POSTOVIT *et al.*, 2002), sollte die Beteiligung von konventionellen Calpainen bzw. ihrer entsprechenden Isoformen an den Signaltransduktionsmechanismen der Expression von MMP-2 und MMP-9 sowohl mittels Calpain-Inhibitoren als auch anhand der etablierten AS- und RNAi-Zellsysteme überprüft werden.

Sollte nicht nur in *capn1*AS- und *capn2*AS-Zellen, sondern auch bei zu Makrophagen bzw. Granulozyten differenzierten THP-1-Zellen eine Korrelation zwischen Calpain-Aktivität und MMP-Expression detektiert werden, war vorgesehen mögliche Calpain-regulierte Signaltransduktionswege und -faktoren im Detail zu identifizieren. Anschließend sollten diese Faktoren auch hinsichtlich ihrer Proteinexpression und Aktivität untersucht werden.

## C Material und Methoden

### C.1 Material

#### C.1.1 Geräte

##### AUTOKLAVEN:

3850

VST 500-C 12D

Systec GmbH, Wettenberg

Zirbus, Bad Grund

##### CO<sub>2</sub>-INKUBATOREN:

Forma Scientific Modell 3682

Galaxy S

Jouan IG 150

Forma Scientific, Marietta, USA

Nunc, Wiesbaden

Jouan GmbH, Unterhaching

##### DNA SEQUENZIERER:

Typ 377A

Applied Biosystems, Foster City, USA

##### DURCHFLUSSZYTOMETER:

Epics XL-MCL

Beckman Coulter, Krefeld

##### EISMASCHINE:

AF-10

Scotsman, Frimont, Italien

##### GEL-BILDERFASSUNGSSYSTEM:

Image Master<sup>®</sup> VDS

Pharmacia, Freiburg

##### HORIZONTALE DNA ELEKTORPHORESEAPPARATUR:

HE 33 mini *submarine unit*

Hoefer, Heidelberg

HE 99X max *submarine unit*

Hoefer, Heidelberg

##### HYBRIDISIERUNGSOFEN:

Mini Hybi

H. Saur, Reutlingen

##### LYOPHILISATOR:

Alpha 1-6 Vakuum Pumpe Typ DUO 004 mit

Heraeus-Christ, Ostreode

Speedvac Konzentrator

Bachofer, Reutlingen

##### MAGNETRÜHRER:

Ika-Combimag RCO

Janke & Kunkel, Staufen

Ikamag RET

Janke & Kunkel, Staufen

##### MIKROSKOPE:

IX50 mit

Olympus, Feldkirchen-Westerham

CCD Kamera Typ 3CCD

Sony, Köln

UV-Lampe U-RFL-T

Olympus, Feldkirchen-Westerham

IX70 mit

Olympus, Feldkirchen-Westerham

POC Chamber

Pecon, Erbach

SensiCam QE

PCO CCD Imaging, Kehlheim

Tempcontrol 32-2

Pecon, Erbach

Uniblitz<sup>®</sup> VCM-D1 Shutter

Vincent Associates, Rochester, USA

UV-Lampe BH2-RFL-T3

Olympus, Feldkirchen-Westerham

Zeiss LSM 510

Carl Zeiss, Jena

##### MIKROWELLENOFEN:

R-6270

Sharp, Osaka, Japan

##### ORBITALSCHÜTTLER:

Certomat<sup>®</sup> R

Braun Biotech International, Melsungen

Infrons TR150 mit

Infrons AG, Bottmingen, Schweiz

Heissluft Inkubatorofen ITE

Infrons AG, Bottmingen, Schweiz

PCR *THERMAL CYCLER*:

Gene Amp 2400

LightCycler™ II

Primus 25

T *personal*

## pH-METER:

Typ 114D mit

pH Elektrode

## PROTEINTRANSFEREINHEITEN:

MilliBlot™–SDE System

Fastblot B33

## SCANNER:

Image Scanner

## SICHERHEITSWERKBÄNKE:

BDK 7419, Modell UVF 6.18S

Herasafe Typ HS12

## SPANNUNGSQUELLEN:

EPS 500/400

Mighty Slim™

## STICKSTOFFTANK:

Cryosystem 4000

Locator Jr.

Locator 4

## SPEKTROPHOTOMETER:

LKB Ultraspec III

Uvikon 930

## SPECTROFLUORIMETER:

Safire 2

## TIEFKÜHLGEFRIERSCHRANK:

Colora UF 85-300S (-80 °C)

## TRANSLUMINATOR:

DarkReader™

## ULTRASCHALLLANZE:

Branson Sonifier 250

## VERTIKALE PROTEINELEKTROPHORESE-EINHEITEN:

Mighty Small II

Novex™

## VORTEXER:

Vortex Genie 2

## WAGEN:

Analysenwaage, A 120 S

Technische Waage, MA AF200

## WÄRMESCHRÄNKE:

B30

BE30

## WASSERBÄDER:

WB-14

Thermomix ME

## WASSERDEIONISIERUNGSEINHEIT:

Membrapure

Perking Elmer, Langen

Roche, Mannheim

MWG Biotech, Ebersberg

Whatman Biometra, Göttingen

WTW, Weilheim

Ingold, Steinbach-Taunus

Millipore, Eschborn

Whatman Biometra, Göttingen

Pharmacia, Freiburg

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Heraeus Instruments, Göttingen

Pharmacia, Freiburg

Hoefer, Heidelberg

MVE Cryosystems, Jüchen

Sigma, Taufkirchen

Sigma, Taufkirchen

Pharmacia, Freiburg

Kontron Instruments, Eching

Tecan, Crailsheim

Colora, Lorch

Clare Chemical Research, Dolores, USA

Branson, Danbury, USA

Hoefer, Heidelberg

Invitrogen, Karlsruhe

Scientific Industries, New York, USA

Satorius, Göttingen

Satorius, Göttingen

Memmert, Schwabach

Memmert, Schwabach

Memmert, Schwabach

Braun Biotech, Melsungen

MembraPURE, Bodenheim

## ZELLZÄHLSYSTEM

Casy1

Schärfe Systems, Reutlingen

## ZENTRIFUGEN:

Centrikon H-401 (mit Rotoren A6.9 und A8.24)

Kontron Instruments, Eching

Varifuge 3.0 R

Heraeus Sepatech, München

Varifuge 3.2 RS

Heraeus Sepatech, München

Sepatech Biofuge *primo*

Heraeus Sepatech, München

Sepatech Biofuge 15

Heraeus Sepatech, München

Eppendorf 3200

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Eppendorf 5415 D

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Küvetten Zentrifuge, Helma Rotto-vette 310

Bachofer, Reutlingen

## C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

ChromasPro 1.22

Technelysium Pyt Ltd, Tewantin Old, Australien

GraphPad® Prism 3.03

GraphPad Software, San Diego, USA

Image-Pro® PLUS

Media Cybernetics, Silver Spring, USA

LightCycler Software 3.5

Roche, Mannheim

Microsoft Office EXCEL 2003

Microsoft, Unterschleissheim

Openlab 4.0.2

Improvisation Limited, Coventry, UK

SECentral

SciEdSoftware, Cary, USA

System II 2.0

Beckman Coulter, Krefeld

TotalLab v2.01

NonLinear Dynamics, Durham, USA

XFluor4 Safire2

Tecan, Crailsheim

Magic Scan V4.4

Pharmacia, Freiburg

Für die Identifikation von potentiellen siRNA-Sequenzen wurden die mRNA-Transkripte (NCBI *Nucleotide* Datenbank, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) der zu regulierenden Zielgene mit den Online-Programmen *siRNA Target Finder* (Ambion, Woodward, USA; [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)), *siRNA Design Tool* (Qiagen, Hilden; <http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx>) und der *RNAi Design Software* (OligoEngine, Seattle, USA; <http://www.oligoengine.com>) analysiert.

Für die Auswahl einer siRNA-Sequenz waren folgende Punkte essentiell: (1) Der siRNA-Zielsequenz, deren GC-Gehalt zwischen 45 – 55 % liegen soll, müssen (2) zwei Adenosin-Nukleotide vorstehen. (3) Des Weiteren sollte die Zielsequenz im ersten kodierenden Drittel der cDNA lokalisiert sein. (4) Die Vermeidung von mehr als drei gleichen, aufeinander folgenden Nukleotide, besonders von Adenosin und Thymidin, sollte die Bildung von Sekundärstrukturen und eine unerwünschte Transkriptionstermination verhindern (siehe Kapitel C.2.1.2.2). (5) Sollen die Zielsequenzen in Vektor-basierten Systemen eingebaut werden, muss eine Purin-Base (A oder G) den Transkriptionsstartpunkt markieren. Die Spezifität der siRNA-Zielsequenzen wurde abschließend in einem transkriptomweiten Vergleich mit dem Programm *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sichergestellt.

Das Design zur Herstellung der 81 Aminosäure langen *linker*-Sequenz zwischen Talin *head* und Talin *rod* wurde anhand der Daten von Topma und Mitarbeiter (TOMPA *et al.*, 2004) durchgeführt. Dabei wurden die Online-Programme *PSI-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) für die wiederholende Analyse von Sequenzähnlichkeiten, *GlobPlot* (<http://globplot.embl.de/>) für die Neigung zur Bildung globulärer oder unorganisierter Domä-

nen sowie der *PredictProtein*-Server (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) zur Vorhersage von Sekundärstrukturen mit den Algorithmen *JPred* (CUFF *et al.*, 1998), *PSIPRED* (MCGUFFIN *et al.*, 2000) und *PHD* (ROST & SANDER, 1993) verwendet. Potentielle PEST-Sequenzen in Polypeptiden wurden mit dem Programm *PESTfinder* (<https://embl.bcc.univie.ac.at/content/view/21/45/>) analysiert.

### C.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien hatten „p. a.“ Qualität. Die Reaktions- und Kultivierungsgefäße wurden entweder steril bezogen oder vor der Verwendung bei 121 °C und  $1 \times 10^5$  Pa Überdruck für 20 Min autoklaviert.

#### C.1.3.1 Allgemeine Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Serva, Heidelberg
Brij-35	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau R250 und G250	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Glutardialdehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumvanadat	Sigma, Deisenhofen
Nonident P-40	Sigma, Deisenhofen
Orange G	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg

### C.1.3.2 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

<i>1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis</i> -Kit	Roche, Mannheim
Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
AmpoLabeling-LRP-Kit	Superarray, Frederick, USA
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
<i>calf intestine phosphatase</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
DNA Molekulargewichtsmarker V, VII	Roche, Mannheim
DNA <i>sequencing</i> -Kit BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
DNase	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
GEArray <sup>®</sup> Q Serie <i>signaltransduktion pathfinder</i>	Superarray, Frederick, USA
GeneRuler <sup>™</sup> DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Gel extraction</i> -Kits QIAquick, QIAex	Qiagen, Hilden
<i>LightCycler FastStart DNA master SYBR green I</i>	Roche, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Midi- und Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
QuikChange <i>multi site-directed</i> Mutagenese-Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA
	Roche, Mannheim
RNeasy MinElute-Kit	Qiagen, Hilden
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, Beverly, USA

#### C.1.3.2.1 Vektoren

*E. coli* Klonierungs-Vektor: pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

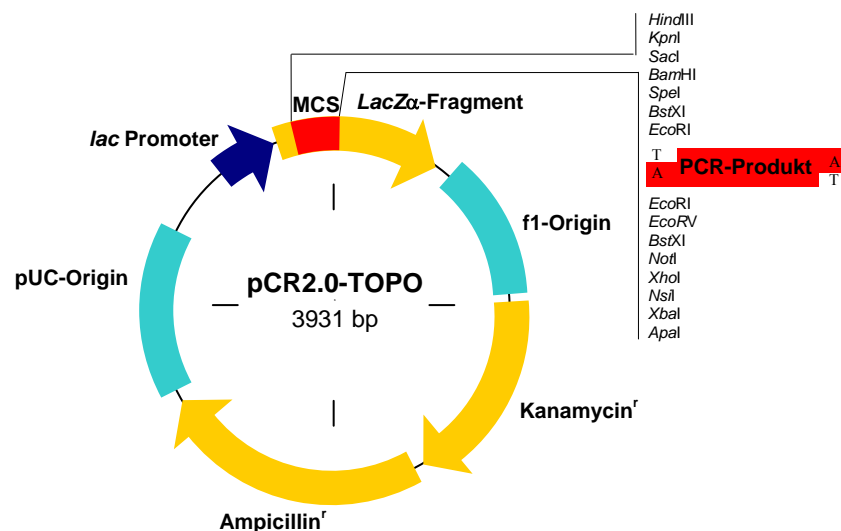


Abbildung C.1 Schematische Darstellung des *E. coli* Klonierungs-Vektors pCR2.1-TOPO.

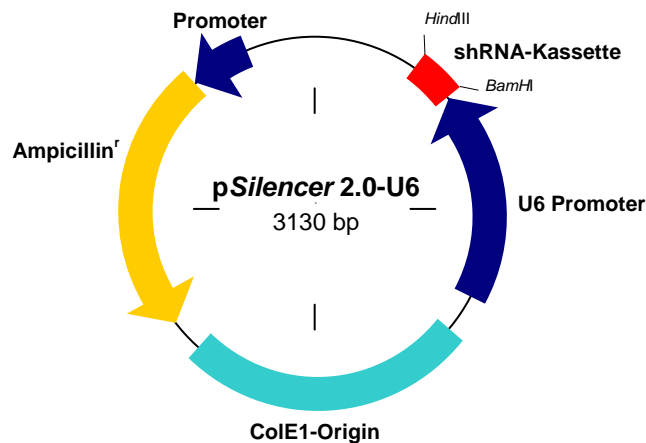


*Taq*-Polymerasen haben eine terminale Transferase-Aktivität, die ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende eines PCR-Produktes anfügen. Über einzelne, überhängende Desoxythymidin-Reste an den 3'-Enden des linearisierten Vektors pCR2.1-TOPO (Abbildung C.1) können daher effizient und zeitsparend PCR-Fragmente und Klonierungs-Vektor miteinander verbunden werden.

Die Reaktion wird mit Hilfe der Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus katalysiert. Dabei bindet die Topoisomerase I an spezifische Stellen der dsDNA und spaltet die Phosphodiesterbindung eines Stranges nach dem Sequenzmotiv 5'-CCCTT. Die Energie des hydrolysierten Phosphodiester-Rückgrates wird durch die Formation einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Strangs und eines Tyrosyl-Restes (Tyr<sup>274</sup>) der Topoisomerase konserviert. Die Phospho-Tyrosylbindung zwischen Enzym und DNA kann durch nukleophilen Angriff des 5'-Hydroxyl-Sauerstoffatoms eines PCR-Produktes die Reaktion umkehren und die Topoisomerase freisetzen (SHUMAN, 1994).

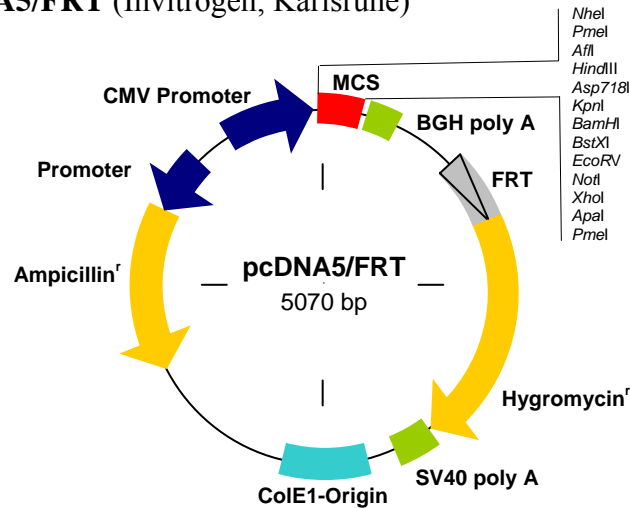
Positive Klone können anschließend über Blau/Weiß-Selektion der Kolonien identifiziert werden, da bei erfolgreicher Ligation des PCR-Produktes das *LacZα*-Fragment unterbrochen wird. Selektives Wachstum der *E. coli* Klone wird durch die Antibiotika-Resistenzen gegen Ampicillin (Ampicillin<sup>r</sup>) bzw. Kanamycin (Kanamycin<sup>r</sup>) erreicht. Der Vektor besitzt sowohl einen pUC19 Replikationsstartpunkt (pUC-Origin) als auch eine f1 Startsequenz (f1-Origin) für die Einzelstrang DNA-Produktion.

**RNAi-Vektor: pSilencer 2.0-U6** (Ambion, Woodward, USA)

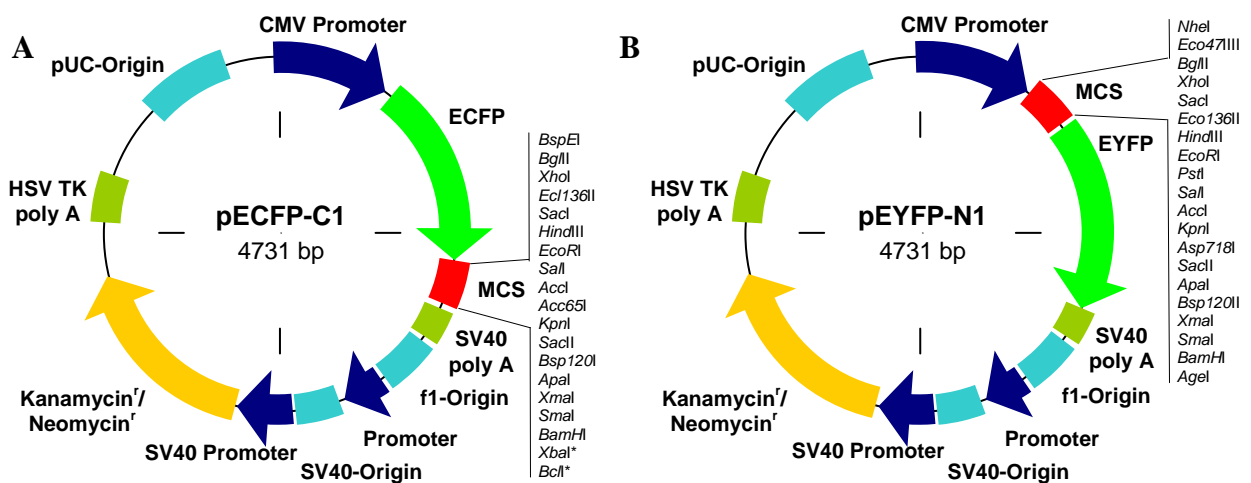


**Abbildung C.2** Schematische Darstellung des RNAi-Vektors pSilencer 2.0-U6.

Der RNAi-Vektor pSilencer 2.0-U6 (Abbildung C.2) trägt den humanen U6 RNA-Polymerase III Promoter, der für die Expression kleiner RNA-Transkripte verantwortlich ist. Über die Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III können *short hairpin* RNA (shRNA)-Kassetten mit der entsprechenden Zielsequenz eingebracht werden (siehe Kapitel C.2.1.2.2). Neben der shRNA-Kassette und dem U6 Promoter beinhaltet der Vektor die kodierende Sequenz für  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin<sup>r</sup>) und den ColE1 Replikationsstartpunkt (ColE1 Origin).

*Flp-in-Vektor: pcDNA5/FRT* (Invitrogen, Karlsruhe)**Abbildung C.3** Schematische Darstellung des *Flp-in-Vektors pcDNA5/FRT*.

Die Generierung stabiler Klone führt aufgrund der zufälligen Integration des Expressions-Vektors in das Genom oft zu klonalen Heterogenitäten bezüglich des Expressionsniveaus. Integriert der Vektor in einen transkriptionell reprimierten Genomlocus, so kann die Expression des gewünschten Gens vermindert oder vollständig verhindert sein. Der Expressionsvektor pcDNA5/FRT (Abbildung C.3) der Firma Invitrogen umgeht diese klonalen Variationen durch die spezifische Integration in einen transkriptionell aktiven Genomlocus der Wirtszelle (Review siehe SAUER, 1994). Die Flp-In Wirtszelllinien besitzen eine singuläre Flp- Rekombinase-Erkennungssequenz (FRT, Flp *recombinase target*), wodurch bei der Kotransfektion des Expressionsvektors mit einem Flp-Rekombinase Expressions-Vektor eine stabile Integration des gewünschten Transgens vermittelt wird. Aufgrund der Tatsache, dass das Gen für die Hygromycin-Resistenz (Hygromycin<sup>r</sup>) kein Startcodon besitzt, bedarf es der spezifischen Integration des Transgens in eine FRT-Erkennungsstelle, wodurch das ATG-Startcodon für die Antibiotikaresistenz bereitgestellt wird. Der Vektor trägt zudem einen ColE1 Replikationsstartpunkt (ColE1-Origin) und die kodierende Sequenz der  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin<sup>r</sup>) für die selektive Vermehrung in *E. coli*.

*Fluoreszenzprotein-Vektoren: pEYFP-N1 & pECFP-C1* (Clontech, Mountain View, USA)**Abbildung C.4** Schematische Darstellung der Fluoreszenzprotein-Vektoren *pECFP-C1* und *pEYFP-N1*.

Das gewünschte Gen kann entweder am COOH-Terminus des Fluoreszenzproteins (A, *pECFP-C1*) oder NH<sub>2</sub>-terminal fusioniert sein (B, *pEYFP-N1*).

Die Fluoreszenzprotein-Vektoren pECFP-C1 und pEYFP-N1 (*enhanced cyan/yellow fluorescent protein* fusioniert am COOH- oder NH<sub>2</sub>-Terminus des Zielgens) (Abbildung C.4) von der Firma Clontech sind Derivate des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* (ORMÖ *et al.*, 1996) und können für Lokalisations- und Interaktionsstudien *in vivo* genutzt werden. Spezielle Chromophore mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionsspektren wurden durch Aminosäuremutationen generiert, die neben der Wellenlängenverschiebung auch eine bessere Löslichkeit und Faltung des Proteins erlauben (Tabelle C.1).

**Tabelle C.1** *Chromophor-Mutationen von GFP-Derivaten*

Chromophor	Mutationen	$\lambda$ Ex [nm]	$\lambda$ Em [nm]
EBFP	P <sup>64</sup> L, S <sup>65</sup> T, <b>Y<sup>66</sup>H</b> , Y <sup>145</sup> P	380	440
ECFB	P <sup>64</sup> L, S <sup>65</sup> T, <b>Y<sup>66</sup>W</b> , N <sup>146</sup> I, M <sup>153</sup> T, V <sup>163</sup> A	433	453
EGFB	P <sup>64</sup> L, S <sup>65</sup> T	488	507
EYFP	S <sup>65</sup> G, V <sup>68</sup> L, S <sup>72</sup> A, <b>T<sup>203</sup>Y</b>	513	527

Die fettgedruckten Aminosäuremutationen sind für die Farbvariation verantwortlich.

$\lambda$  Ex, Extinktionswellenlänge;  $\lambda$  Em, Emissionswellenlänge.

Zusätzlich zu den Mutationen der Chromophore tragen die kodierenden Sequenzen der Fluoreszenzproteine über 190 stille Mutationen, wodurch die optimale humane Codon-Verwendung gewährleistet wird. Diese Modifikationen erlauben den Einsatz der Vektorsysteme in verschiedenen Säugetierzellen (HAAS *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden die NH<sub>2</sub>-terminalen flankierenden DNA-Sequenzen der Fluoreszenzproteine zu Kozak-konsensus Translations-Initiationsstellen (KOZAK, 1987) mutiert, um so eine optimal CMV-Promoter gesteuerte mRNA-Expression zu gewährleisten. Bei der Herstellung von Fusionsproteinen ist auf den Leserahmen und insbesondere bei der Verwendung von pEYFP-N1, auf interne Stop-Codons zu achten. Die Vektoren tragen für die Replikation eine SV40 Startpunktsequenz (SV40-Origin) sowie ein Neomycin-Resistenz-Gen (Neomycin<sup>r</sup>) für die Selektion in Säugetierzellen. Ein bakterieller Promoter vor der Neomycin<sup>r</sup> ist für die Expression des Kanamycin-Resistenz-Gens (Kanamycin<sup>r</sup>) in *E. coli* verantwortlich. Die Vektoren besitzen einen pUC19 Replikationsstartpunkt (pUC-Origin) für die Vermehrung in *E. coli* und eine f1 Startsequenz (f1-Origin) für die Einzelstrang DNA-Synthese.

### C.1.3.2.2 Oligonukleotide für PCR, RNAi, Mutagenese und Plasmidkonstruktion

#### *RNA-Oligonukleotide für die Generierung von siRNAs*

<i>ns_Sense</i>	5'> UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT <3' - FITC
<i>ns_Antisense</i>	5'> ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT <3' - FITC
<i>egfp_Sense</i>	5'> GUUCAGCGUGUCCGGCGAGdTdT <3'
<i>egfp_Antisense</i>	5'> CUCGCCGGACACGCUGAACdTdT <3'
<i>capn1_Sense</i>	5'> GGUAAAUAGGCAGCUACGAGdTdT <3'
<i>capn1_Antisense</i>	5'> CUCGUAGCUGCCAUUUACCDdTdT <3'
<i>capn2_Sense</i>	5'> GUACCUCAACCAGGACUAC dTdT <3'
<i>capn2_Antisense</i>	5'> GUAGUCCUGGUUGAGGUAC dTdT <3'
<i>capn4_Sense</i>	5'> AUGUGCUUGGAGGCCUGAUdTdT <3'
<i>capn4_Antisense</i>	5'> AUCAGGCCUCCAAGCACAUdTdT <3'

**Oligonukleotide für die Herstellung des Vektor-vermittelten RNAi-Systems (pRNAi)**

<i>Bgl</i> III_U6For	5'> GGAAGATCTCCGGCTCGTATGTTG <3'
<i>Bgl</i> III_U6Rev	5'> GGAAGATCTGTTTTCCTCCAGTCACG <3'
<i>Hind</i> III_kill	5'> CGTTTAAACTTAAGCGGATGGGTCCGGTCTC <3'
<i>Bam</i> HI_chg_KpnI	5'> CCAGACTATGCGGGTACCATGGTGAGCAAG <3'

**Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung**

SP6For	5'> ATTTAGGTGACACTATAG <3'
CMVFor	5'> CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG <3'
TalinFor	5'> AGACGACAGAAGGCGAGCAG <3'
EGFPC	5'> CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG <3'
EGFPN	5'> CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG <3'
LentiFor	5'> TAATACGACTCACTATAGGG <3'

**Oligonukleotide für die Herstellung der shRNA-Kassetten**

(Die jeweiligen Zielsequenzen sind in roter Farbe fett und kursiv gedruckt).

shRNA <sub>Ans</sub> For	5'>GATCC <b>ACTACCGTTGTTATAGGTG</b> TTCAAGAGACACCTA-TAACAACGGTAGTTTTTTGGAAA <3'
shRNA <sub>Ans</sub> Rev	5'>AGCTTTTCCAAAAAACTACCGTTGTTATAGGTGTCTCTT-GAACACCTATAACAACGGTAGTG <3'
shRNA <sub>egfp</sub> For	5'>GATCCC <b>GTTACGCGTGTCGGCGAG</b> TTCAAGAGACTCGC-CGGACACGCTGAACTTTTTTGGAAA <3'
shRNA <sub>egfp</sub> Rev	5'>AGCTTTTCCAAAAAAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGTCTCT-TGAACTCGCCGGACACGCTGAACGG <3'
shRNA <sub>capn1</sub> For	5'>GATCCC <b>GGTAAATGGCAGCTACGAG</b> TTCAAGAGACTCGT-AGCTGCCATTTACCTTTTTTTGGAAA <3'
shRNA <sub>capn1</sub> Rev	5'>AGCTTTTCCAAAAAAAGGTAAATGGCAGCTACGAGTCTCT-TGAACTCGTAGCTGCCATTTACCGG <3'
shRNA <sub>capn2</sub> For	5'>GATCCC <b>GTACCTCAACCAGGACTACT</b> TTCAAGAGAGTAGT-CCTGGTTGAGGTACTTTTTTTGGAAA <3'
shRNA <sub>capn2</sub> Rev	5'>AGCTTTTCCAAAAAAAGTACCTCAACCAGGACTACTCTCT-TGAAGTAGTCCTGGTTGAGGTACGG <3'
shRNA <sub>capn4</sub> For	5'>GATCCC <b>ATGTGCTTGGAGGCCTGAT</b> TTCAAGAGAATCAG-GCCTCCAAGCACATTTTTTTGGAAA <3'
shRNA <sub>capn4</sub> Rev	5'>AGCTTTTCCAAAAAAATGTGCTTGGAGGCCTGATTCTCT-TGAAATCAGGCCTCCAAGCACATGG <3'

**Oligonukleotide für die Herstellung verschiedener Talin-Konstrukte**

<i>Eco</i> RI_Talin <sup>1</sup> For	5'> CGGAATTCTATGGTTGCGCTTTCGCTG <3'
<i>Eco</i> RI_Talin <sup>434</sup> For	5'> CGGAATTCTCAGCAGTACAACCGAGTG <3''
<i>Kpn</i> I_Talin <sup>434</sup> Rev	5'> GGGTACCCCCTGCTGAAGGACTGTTGA <3'
<i>Kpn</i> I_Talin <sup>1071</sup> Rev	5'> GGGTACCCCAGCTGCTGCTTTTATTTC <3'

**Oligonukleotide für die Mutagenese verschiedener Talin-Konstrukte**

<i>tln</i> IL <sup>432</sup> G	5'> CAAAAAGTCAACAGTCGGTCAGCAGCAGTACAACC <3'
<i>tln</i> IY <sup>436</sup> P	5'> CAGTCCTTCAGCAGCAGCCCAACCGAGTGGGGAAAG <3'
<i>tln</i> IL <sup>432</sup> M	5'> CAAAAAGTCAACAGTCATGCAGCAGCAGTACAACC <3'
<i>tln</i> IQ <sup>435</sup> R	5'> CAACAGTCGCTCAGCAGCGGTACAACCGAGTGGGG <3'
<i>tln</i> IN <sup>437</sup> M	5'> CGCTCAGCAGCGGTACATGCGAGTGGGGAAAGTGG <3'

**Oligonukleotide für die Herstellung von pECFP-C1+capn2**

*EcoRI*\_capn2For 5'> AAGCAAGCTTCCATGGCGGGCATCGCG <3'

*KpnI*\_capn2Rev 5'> GTTATCTAGATTATCAAAGTACTGAGAAAC <3'

**Oligonukleotide für die Sequenzierung von pECFP-C1+capn2**

*capn2*\_295 5'> CAAGGAGCCCTAGGTGACTG <3'

*capn2*\_715 5'> GGCTGCTCCATCGACATCAC <3'

*capn2*\_1043 5'> TCACCAGCGATACCTACAAG <3'

*capn2*\_1448 5'> TTCTCGTGCCTTCCACCTTC <3'

*capn2*\_1881 5'> GCGGAAGGCATTAGAAGAAG <3'

**Primer für die quantitative RT-PCR**

Alle Primer für die quantitative RT-PCR wurden von Search LC (Heidelberg) bezogen: Calpain 1, Calpain 2, Calpain 4, Calpastatin, GAPDH,  $\beta$ -Aktin, Cyclophilin B, 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS), PKC $\epsilon$ , TNF- $\alpha$  sowie c-fos.

**C.1.3.3 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken**

Ampicillin Natrium-Salz

Merck, Darmstadt

Bacto Agar

Difco, Augsburg

Bacto Hefeextrakt

Difco, Augsburg

Bacto Trypton

Difco, Augsburg

Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000 ml

Wagner und Munz, München

Glycerin

Serva, Heidelberg

Kanamycinsulfat

Roche, Mannheim

Kryoröhrchen, 1,8 ml

Nunc, Wiesbaden

Petrischalen, Polystyrol 9 cm Ø

Greiner, Nürtingen

**Bakterienstämme**

Die Bakterienstämme der Stammsammlung wurden durch Transformation der unten aufgeführten *E. coli*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden erhalten.

**TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe)**

Genotyp: F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*

**JM110 (Stratagene, La Jolla, USA)**

Genotyp: *rps*, (Str<sup>r</sup>), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [F' *traD36*, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup> $\Delta$  M15]

**XL-10 GOLD (Stratagene, La Jolla, USA)**

Genotyp: Tet<sup>r</sup>  $\Delta$ (*mcrA*)183,  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, Hte [F' *proAB lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

### C.1.3.4 Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken

Accutase	PAA, Linz, Österreich
<i>cell motility</i> HitKit® HCS Reagenz-Kit	Cellomics, Berkshire, UK
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm Ø, 8 µm PorenØ	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Linz, Österreich
DMEM mit Hepes, ohne Phenolrot	Gibco BRL, Paisley, Schottland
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
Giemsa- und May-Grünwald-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin, Ca <sup>2+</sup> -Salz, <i>Streptomyces globatus</i>	Calbiochem, La Jolla, USA
Nutridoma	Roche, Mannheim
PMA	Sigma, Deisenhofen
RNase	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
RPMI 1640 mit Hepes, ohne Phenolrot	PAA, Linz, Österreich
Trypan-Blau, 0,2 % (w/v) in PBS	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Linz, Österreich
Zellkulturgefäße (T25, T75, T185)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96well)	Nunc, Wiesbaden

#### **Säugetierzelllinien**

##### Hek293-Flp-in™ T-REx™ (Invitrogen, Karlsruhe)

Für die initiale Bewertung der siRNA-Sequenzen und Etablierung der Vektor-basierten RNAi-Systeme wurde die leicht zu transfizierende E1 Antigen-transformierte embryonale Nierenzelllinie Hek293 (*human embryonic kidney*), die nicht von Krebszellen abstammt, verwendet. Die von Invitrogen bezogene Zelllinie ist stabil mit einer singulären Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT) (ANDREWS *et al.*, 1985) und mit der Tetracyclin (Tet)-Repressor kodierenden Sequenz transfiziert. Werden Hek293-Flp-in™ T-REx™-Zellen mit Vektoren transfiziert, die ebenfalls eine FRT-Erkennungssequenz und einen Promoter mit dem Tet-Operator (TetO) besitzen, können diese in Gegenwart der Rekombinase Flp stabil in das Genom integriert werden. Der Tet-Repressor bindet an die Tet-Operator-Stellen und blockiert dabei effektiv die Transkription des Transgens. Nach der Zugabe des Induktors Tet löst sich der Tet-Repressor und die Transkription wird unbehindert durchgeführt.

##### HeLa (DSMZ# ACC 57) und HeLa-T-REx™ (Invitrogen, Karlsruhe)

Die *Cervix*-Adenokarzinom-Zelllinie HeLa (SCHERER *et al.*, 1953) wurde von der Firma Invitrogen stabil mit der Tet-Repressor codierenden Sequenz transfiziert und kann somit für Tet-induzierte Expressionen verwendet werden. Die Epithel-ähnlich wachsenden HeLa-Zellen ohne Tet-Repressor wurden für die Etablierung und Analyse der RNAi-Strategien und als Vergleichszellen zu den stabilen HeLa-AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* verwendet.

##### HeLa AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS*

Zur Analyse der Calpain-isoformspezifischen Funktionen wurden in unserer Gruppe mittels HeLa-Zellen stabile AS-Zelllinien gegen CP1 und CP2 hergestellt und die Klone mit der höchsten Expressionsreduktion *capn1AS* und *capn2AS* benannt (TANNENBERG, 2000). Eine mit dem Leervektor stabil transfizierte Kontrollzelllinie wurde *mock* genannt. Die Erkennungssequenzen der Antisense-Fragmente sind 99 bp (*capn1AS*) bzw. 89 bp (*capn2AS*) lang und liegen im 5'-untranslatierten Bereich der jeweiligen Gene. Die AS-Zelllinien wurden unter Selektionsdruck (100 µg/ml Neomycin) kultiviert.

**THP-1** (DSMZ# ACC 16)

Für die Analyse des Differenzierungsgrades bei der Calpain-vermittelten Migration wurden zwei Leukämie-Zelllinien verwendet. Die humane leukämische Zelllinie THP-1 wurde von dem Blut eines Jungen mit akuter monozytischer Leukämie etabliert (TSUCHIYA *et al.*, 1980). Diese Zelllinie kann mittels Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) zu Makrophagen-ähnlichen bzw. mittels *all trans*-Retinsäure und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Granulozyten-ähnlichen Zellen differenziert werden (AUWERX, 1991, DREXLER *et al.*, 1995).

**C.1.3.5 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken**

4 – 20 % Tris-Glycin Acrylamidgele	Invitrogen, Karlsruhe
BioMax	Kodak, Rochester, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, Rochester, USA
Gelatine	Merck, Darmstadt
Hyperfilm-MB	Amersham, Braunschweig
Mowiol	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
SeeBlue® Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

**C.1.3.6 Substrate und Inhibitoren**

Calpain-Substrat, Suc-LLVY-NHMec	Bachem, Weil am Rhein
Caspase 3/7-Substrat, Suc-DEVD-NHMec	Bachem, Weil am Rhein
Calpain-Inhibitor, CP1B	Sigma, Deisenhofen
Calpain-Inhibitor IV, Z-LLY-FMK	Bachem, Weil am Rhein
Caspase 3/7-Inhibitor, Z-DEVD-FMK	Bachem, Weil am Rhein
MEK1/2-Inhibitor, PD98059	Sigma, Deisenhofen
Zyklisches RGD-Peptid	Bachem, Weil am Rhein
Zyklisches RAD-Peptid	Bachem, Weil am Rhein

**C.1.3.7 Weitere Proteine und Antikörper/Konjugate**

**Proteine** (Falls nicht weiter erwähnt, wurden keine rekombinanten Proteine verwendet)

humanes µ-Calpain	Labor Dr. S. Gil Parrado, München
porcines m-Calpain	Calbiochem, Darmstadt
humanes Vitronectin	Promega, Mannheim
humanes Fibronectin	Sigma, Deisenhofen
humanes Kollagen IV	Sigma, Deisenhofen
humanes Laminin	Sigma, Deisenhofen

**Antikörper** (Falls nicht weiter erwähnt, erkennen alle Antikörper humane Antigene)

<i>mouse</i> anti-Aktin (AC-40)	Sigma, Deisenhofen
<i>mouse</i> anti-Talin (8D4)	Sigma, Deisenhofen
<i>mouse</i> anti-Calpain <i>small subunit</i>	Chemicon, Temecula, USA
<i>mouse</i> anti-µ-Calpain (2H2A7C2)	Alexis, Lausen, CH
<i>rabbit</i> anti-m-Calpain	RDI, Flanders, USA

*rabbit anti-Calpastatin*  
*mouse anti-Vimentin (3B4)*  
*mouse anti-Vinculin (V282)*  
*rabbit anti-RhoA (119)*  
*mouse anti-MMP-2 (75-7F7)*  
*mouse anti-MMP-9 (GE-213)*  
*mouse anti-MT1-MMP*  
*mouse anti-Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (LM609)*  
*mouse anti-Integrin  $\beta_1$  (JB1A)*  
*rabbit anti-FAK (2999)*  
*rabbit anti-Rac1*  
*sheep anti-Cdc42 (ACD02)*  
*rabbit anti-m-Calpain (RP1)*  
*rabbit anti- $\mu$ -Calpain (RP3)*  
*mouse anti-ERK2 (3A7)*  
*mouse anti-P-ERK1/2 (E10)*  
*rabbit anti-MEK1/2*  
*rabbit anti-P-MEK1/2*  
*rabbit anti-Caspase 9*  
*rabbit anti-CDK4*  
*rabbit anti-Cyclin D1*  
*rabbit anti-Cyclin D2*  
*rabbit anti-Cyclin D3*  
*rabbit anti-P-Rb (Ser<sup>780</sup>)*  
*rabbit anti-P-Rb (Ser<sup>249</sup>/Thr<sup>251</sup>)*  
*rabbit anti-p15<sup>Ink4B</sup>*  
*rabbit anti-p19<sup>Ink4D</sup>*  
*mouse anti-p21<sup>Cip1</sup>*  
*rabbit anti-p27<sup>Kip1</sup>*  
*mouse anti-p53*  
*mouse anti-Ezrin (3C12)*  
*mouse anti-CD34-FITC*  
*mouse anti-CD69-PE*  
 Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>-FITC  
 Isotypkontrolle IgG<sub>2a</sub>-PE

ABR Affinity Bioreagents, Golden, USA  
 Novocastra, Newcastle, UK  
 RDI, Flanders, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 Oncogene, Darmstadt  
 Oncogene, Darmstadt  
 Oncogene, Darmstadt  
 Chemicon, Temecula, USA  
 Chemicon, Temecula, USA  
 Abcam, Cambridge, UK  
 Cytoskeleton, Denver, USA  
 Cytoskeleton, Denver, USA  
 Triple Point Biologics, Portland, USA  
 Triple Point Biologics, Portland, USA  
 Cell signalling, Beverly, USA  
 Cell signalling, Beverly, USA  
 Cell signalling, Beverly, USA  
 Cell signalling, Beverly, USA  
 Labor Dr. Guy Salvesen, La Jolla, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 SCBT, Santa Cruz, USA  
 Cell signalling, Beverly, USA  
 Abcam, Cambridge, UK  
 Caltag, Hamburg  
 Caltag, Hamburg  
 Caltag, Hamburg  
 Caltag, Hamburg

### **Konjugate**

*goat anti-mouse HRP-linked*  
*goat anti-rabbit HRP-linked*  
*donkey anti-sheep HRP-linked*  
*goat anti-mouse Alexa633-linked*  
*chicken anti-rabbit Alexa633-linked*  
*goat anti-mouse Alexa433-linked*  
*chicken anti-rabbit Alexa433-linked*  
*goat anti-rabbit PE-linked*

New England Biolabs, Beverly, USA  
 New England Biolabs, Beverly, USA  
 Cytoskeleton, Denver, USA  
 Molecular Probes, Leiden  
 Molecular Probes, Leiden  
 Molecular Probes, Leiden  
 Molecular Probes, Leiden  
 Caltag, Hamburg



## C.2 Methoden

### C.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die meisten verwendeten molekularbiologischen Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Sambrook *et al.* durchgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Abweichende Methoden und neu etablierte Techniken werden einzeln erläutert.

#### C.2.1.1 Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen

##### C.2.1.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für analytische und präparative Zwecke wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen mittels der Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen gewonnen. Die modifizierte Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Dafür wurden Über-Nacht-Kulturen bei 5000 x g für 10 Min pelletiert und anschließend in einem RNase-haltigen Puffer resuspendiert. Durch Zugabe des basischen Puffers wurden die Zellen für 5 Min lysiert. Nach Neutralisation wurde die chromosomale DNA durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und die Plasmid-DNA an einen Anionenaustauscher oder an eine hydrophobe Matrix gebunden. Durch zweimaliges Waschen wurden Protein-, RNA- und niedermolekulare Verunreinigungen beseitigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte im Falle des Anionenaustauschers durch hohe Salzkonzentrationen oder mit ddH<sub>2</sub>O bei der Benutzung einer hydrophoben Matrix. Die eluierte DNA wurde für die Verwendung in Zellkulturexperimenten anschließend durch Waschen mit Isopropanol und 70 % (v/v) Ethanol weiter gereinigt, in ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

##### C.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Für die Bestimmung der DNA- ( $c_{DNA}$ ) und RNA-Konzentration ( $c_{RNA}$ ) wurde spektroskopisch die Absorption bei 260 nm ( $A_{260nm}$ ) bestimmt. Die Berechnung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte nach folgender Formel:

$$c_{DNA/RNA} = \text{Absorptionskoeffizient} \times A_{260nm} \times \text{Verdünnung} \times \frac{\mu g}{ml}$$

wobei der Absorptionskoeffizient bei einer Weglänge von 1 cm für dsDNA 50 und für dsRNA 40 entspricht. Protein-Verunreinigungen wurden durch den Quotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  ermittelt. Bei einem Verhältnis von  $> 1,8$  konnte von proteinfreien Nukleinsäurelösungen ausgegangen werden.

##### C.2.1.1.3 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Die Restriktion mit spezifischen Endonukleasen wurde für die Linearisierung von Plasmiden oder zum Ausschneiden gewünschter DNA-Fragmente verwendet. Die analytische Restriktion diente der Analyse rekombinanter Plasmide, während durch präparative Restriktion die Subklonierung von DNA-Sequenzen angestrebt wurde. Geschnittene DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und bei Bedarf für die weitere Verarbeitung aus dem Agarose-Gel eluiert. Für den Verdau wurden 10 U Endonuklease pro 1 µg DNA im entsprechenden Puffer eingesetzt und bei 37 °C für 1 Std inkubiert.

Zuvor ausgeschnittene DNA-Fragmente wurden durch Ligation für die Herstellung rekombinanter DNA-Konstrukte miteinander verknüpft. Dabei wurde für die Ligation von überhän-

genden und geraden Enden ein 5 – 100 facher molarer Überschuss des kleineren DNA-Fragmentes mit 100 ng Plasmid-DNA sowie 1 U T4-DNA-Ligase versetzt und 1 Std bei 16 °C inkubiert.

#### **C.2.1.1.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA- und RNA-Fragmenten**

Vor der Ligation bzw. vor der Hybridisierung wurden DNA-Fragmente und siRNA-Oligonukleotide mit der T4 Polynukleotid Kinase (PK) phosphoryliert. Die PK katalysiert den Transfer des  $P_i$  in der  $\gamma$  Position von ATP zur 5'-Hydroxyl-Gruppe von Polynukleotiden (dsDNA, ssDNA und RNA). Für die Phosphorylierung wurden 100 – 300 pmol Polynukleotid in einem 50  $\mu$ l Ansatz mit 10 U PK und 1 mM ATP im entsprechenden Puffer verdünnt und für eine Std bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Inaktivierung der PK für 20 Min bei 65 °C konnte der Ansatz direkt für die Ligations- bzw. Hybridisierungsreaktion verwendet werden.

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu minimieren, wurden die 5'-Enden mittels *calf intestine* Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Dafür wurden 1 U CIP mit 100 pmol linearisiertem Vektor im entsprechenden Puffer verdünnt und für 30 Min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch Chloroform-Phenol-Extraktion entfernt und der dephosphorylierte Vektor durch Ethanolfällung gereinigt.

#### **C.2.1.1.5 Herstellung von siRNAs und shRNA-Kassetten durch Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Zur Herstellung der siRNAs und der shRNA-Kassetten wurden je 1  $\mu$ g komplementäre *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide in 50  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0) verdünnt. Der Hybridisierungsansatz wurde für 5 Min auf 95 °C im Heizblock erwärmt und anschließend bei RT für 1 Std langsam abgekühlt. Die erfolgreiche Hybridisierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### **C.2.1.1.6 Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Überprüfung der Homogenität und Größe sowie der Reinigung gewünschter DNA-Fragmente wurden diese mittels der horizontalen *submarine* Gelelektrophorese mit 1 – 3 %igen Agarose-Gelen analysiert. Die bei hohen Temperaturen schmelzende Seakem-Agarose wurde für analytische Zwecke und die bei niedrigen Temperaturen schmelzende Nusive-Agarose für präparative Gele verwendet. Für die Herstellung des Agarose-Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris/Base, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) mittels eines Mikrowellenofens für 3 Min bei 600 Watt geschmolzen und anschließend 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA- und RNA-Fragmente wurden mit 1/10 Vol Probenpuffer (30 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen-cyanol FF, 0,25 % (w/v) Orange G) gemischt, in die Taschen des Gels geladen und in TAE Puffer mit 5 – 7 V/cm für 1 – 3 Std elektrophoretisch aufgetrennt. Die Polynukleotid-Banden wurden unter einem UV-Transilluminator (302 nm) visualisiert und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten.

#### C.2.1.1.7 Elution von DNA aus dem Agarosegel

Aus dem Agarosegel ausgeschnittene DNA-Banden wurden mit dem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit von Qiagen zur Isolierung der gewünschten Fragmente behandelt. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge Solubilisierungspuffer wurde die Agarose-Gelbande bei 50 °C für 10 Min geschmolzen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an eine Silica-Säule gebunden und mit Ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Hinterher wurde die DNA mit einem basischen Niedrigsalzpuffer eluiert.

#### C.2.1.1.8 DNA-Präzipitation

Zur Konzentrierung und Aufreinigung von Polynukleotiden wurde die Tatsache ausgenutzt, dass DNA in Gegenwart hochkonzentrierter Alkohollösungen und Natriumacetat präzipitiert. Dafür wurden entweder 2,5 Vol Ethanol absolut oder 1 Vol Isopropanol sowie 0,1 Vol Natriumacetat-Lösung (3 M) zur DNA-Lösung zugegeben. Die Mischung wurde für 15 Min bei -20 °C inkubiert und anschließend zur Pelletierung der DNA bei 15000 x g für 30 Min zentrifugiert. Überschüssige Salzreste wurden durch Waschen mit 3 Vol 70 %igen Ethanol entfernt und das gereinigte DNA-Pellet im gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### C.2.1.1.9 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung mittels Fluorescein-markierten Didesoxynukleotiden wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt (SANGER *et al.*, 1977). Die Sequenzier-PCR-Reaktionen erfolgten mit dem DNA *sequencing*-Kit von Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Nach der PCR-Reaktion wurde das Produkt präzipitiert und für die Analyse zur Firma Medigenomix (Martinsried) geschickt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der Software NCBI *BLAST* und *SECentral*.

#### C.2.1.2 Post-transkriptionelle Genrepression mittels RNAi

Unter RNAi versteht man den sequenzspezifischen Abbau von mRNA-Transkripten, der durch 21 – 23 Nukleotid-lange Abbauprodukte doppelsträngiger RNA-Moleküle vermittelt wird. Den Begriff RNAi prägte Fire *et al.* 1998 als er eine spezifische Genrepression durch doppelsträngige RNA bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* untersuchte (FIRE *et al.*, 1998). Dieser generelle Mechanismus der Genrepression wurde unter anderem auch bei Pflanzen als *posttranscriptional gene silencing* (PTGS), *co-suppression* oder *RNA-mediated virus resistance* (LINDBO & DOUGHERTY, 2004) und bei Pilzen und Algen als *silencing* oder *quelling* (GOLDONI *et al.*, 2004) beschrieben.

Für unsere Zwecke sollte ein flexibles System etabliert werden, das den Austausch mehrerer Zielsequenzen in kurzer Zeit ermöglicht. Des Weiteren sollte dieser Vektor ein Reportergen (Marker) aufweisen, um sowohl eine Überprüfung der Transfektionseffizienz als auch eine Zellsortierung über FACS zu gewährleisten. Neben einer Rekombinationsstelle für eine ortsspezifische Transgeninsertion sollte mittels eines Selektionsmarkers auch die Selektion stabiler Klone ermöglicht werden. Deshalb wurde aus mehreren verschiedenen Vektoren über diverse Mutagenesen ein Vektor-basiertes RNAi-System (pRNAi) entwickelt.

### C.2.1.3 Herstellung der Talin-Mutanten durch zielgerichtete Mutagenese

Die gewünschten Mutationen im Talin-Gen wurden durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange *multi site-directed mutagenesis*-Kit von Stratagene eingeführt. Dabei können mehrere Punktmutationen, Aminosäurewechsel, Deletionen oder Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren in nahezu allen doppelsträngigen Plasmiden mittels PCR gleichzeitig eingeführt werden. Für die PCR-Reaktion wurde die *Pfu*Turbo-Polymerase verwendet, die im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 6-fach höhere Genauigkeit bei der Replikation beider Plasmidstränge aufweist und die durch die Primer eingebrachten Mutationen nicht beeinflusst. Bei dieser PCR ist nur ein Primer pro Mutation erforderlich. Sollen gleichzeitig mehrere Mutationen eingeführt werden, so müssen die Primer entweder komplementär zum *sense*- oder *antisense*-Strang sein. Das PCR-Produkt wird anschließend mit der Endonuklease *DpnI* (Zielsequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') behandelt, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA verdaut, um die parentale DNA-Vorlage zu hydrolysieren und mutierte Plasmide zu selektionieren. Dabei muss die parentale DNA-Vorlage aus einem *dam*<sup>+</sup> *E. coli* Stamm gewonnen werden, so dass diese durch *DpnI* prozessiert werden kann. Die geschnittene Vektor-DNA mit den entsprechenden Mutationen wird anschließend in XL-10 Gold kompetente Zellen transformiert. Die geringe Menge an Ausgangsmaterial, die hohe Genauigkeit der *Pfu*Turbo-Polymerase und die niedrige Anzahl an PCR-Zyklen tragen zur hohen Mutationseffizienz bei und verringern potentielle Zufallsmutationen während der Reaktion.

### C.2.1.4 Zusammenfassung aller hergestellten und verwendeten Plasmide

In der Tabelle C.2 sind alle in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide aufgeführt.

**Tabelle C.2 Zusammenfassung der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide**

DNA-Konstrukt	aus	Primer/Oligonukleotid
pSILENCER <sub>ns</sub>	pSILENCER	shRNA <sub>ns</sub> For, shRNA <sub>ns</sub> Rev
pcDNA5/FRT+EGFP	pcDNA5/FRT	-
	pEGFP-C1	-
pRNAi <sub>ns</sub>	pSILENCER	BglII_U6For, BglII_U6Rev,
	pcDNA5/FRT+EGFP	BamHI_chg_KpnI, HindIII_kill
pRNAi <sub>egfp</sub>	pRNAi <sub>ns</sub>	shRNA <sub>egfp</sub> For, shRNA <sub>egfp</sub> Rev
pRNAi <sub>capn1</sub>	pRNAi <sub>ns</sub>	shRNA <sub>capn1</sub> For, shRNA <sub>capn1</sub> Rev
pRNAi <sub>capn2</sub>	pRNAi <sub>ns</sub>	shRNA <sub>capn2</sub> For, shRNA <sub>capn2</sub> Rev
pRNAi <sub>capn4</sub>	pRNAi <sub>ns</sub>	shRNA <sub>capn4</sub> For, shRNA <sub>capn4</sub> Rev
pRNAi <sub>tln1</sub>	pRNAi <sub>ns</sub>	shRNA <sub>tln1</sub> For, shRNA <sub>tln1</sub> Rev
pECFP-C1+capn1*	-	-
pUC18+capn2**	-	-
pECFP-C1+capn2	pUC18+capn2	EcoRI_capn2For, KpnI_capn2Rev
pBluescript+tln_wt***	-	-
pEYFP-N1+tln	pEYFP-N1	EcoRI_Talin <sup>1</sup> For, KpnI_Talin <sup>1071</sup> Rev
pEYFP-N1+tln Head	pEYFP-N1	EcoRI_Talin <sup>1</sup> For, KpnI_Talin <sup>434</sup> Rev
pEYFP-N1+tln Rod	pEYFP-N1	EcoRI_Talin <sup>434</sup> For, KpnI_Talin <sup>1071</sup> Rev
pEYFP-N1+tln over	pEYFP-N1+tln	tlnIY <sup>436</sup> P
pEYFP-N1+tln resistant	pEYFP-N1+tln	tlnIL <sup>432</sup> A, tlnIQ <sup>435</sup> R, tlnIN <sup>437</sup> M
pEYFP-N1+tln control	pEYFP-N1+tln	tlnIL <sup>432</sup> G
pECFP-H2Ai****	-	-

\* hergestellt von Dr. Shirley Gil Parrado; \*\* hergestellt von Dr. Koichi Suzuki; \*\*\* hergestellt von Dr. Richard O. Hynes; \*\*\*\* hergestellt von Dr. Eberhard Spieß; p, Plamid.

### C.2.1.5 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolation der mRNA aus Zellen als initialer Schritt für die Quantifizierung der Transkriptexpression mittels cDNA-Array oder quantitativer RT-PCR wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dafür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und 350  $\mu$ l eines  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Lysispuffers mit hoher Guanidinisothiocyanat-Konzentration direkt auf die adhärennten Zellen oder zum Sediment von Suspensionszellen gegeben. Für eine effektive Zerstörung der Zellmembran wurde das Zelllysate in einem QIAshredder-Filtergefäß für 2 Min bei 15000 x g zentrifugiert, mit 350  $\mu$ l 70 % (v/v) Ethanol vermischt und in ein RNeasy MinElute-Zentrifugationsröhrchen überführt. Die hohe chaotropische Salzkonzentration und Ethanol vermitteln hierbei die spezifische Bindung von RNA-Molekülen, die länger als 200 Nukleotide sind, an eine Silicagel-Membran. Durch zweimaliges Waschen wurden noch vorhandene Verunreinigungen entfernt. Die RNA wurde anschließend mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert.

Sollten quantitative Transkriptanalysen von Plasmid-kodierten Genen wie bei der Etablierung von pRNAi durchgeführt werden, so musste die Vektor-DNA mittels eines DNase-Verdaus eliminiert werden. Hierfür wurden 87,5  $\mu$ l gereinigte RNA mit 10  $\mu$ l DNase-Puffer und 2,5  $\mu$ l DNase (7 U) versetzt und für 20 Min bei RT inkubiert. Die DNase wurde anschließend wie zuvor bei der RNA-Isolierung beschrieben entfernt.

### C.2.1.6 cDNA-Synthese

Als Vorbereitung für die quantitative RT-PCR und für die Klonierung von kodierenden cDNAs aus Geweben und Zellen wurde die isolierte mRNA in einzelsträngige cDNA mittels des 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis-Kit umgeschrieben. Mit Hilfe von 20 U der Avian Myoblastitis Virus Reversen Transkriptase wurden 10  $\mu$ g gereinigte RNA mit 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs, 1,6  $\mu$ g Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer und 50 U RNase Inhibitor in einem Volumen von 20  $\mu$ l vermischt und wie folgt behandelt: 25 °C/10 Min – 42 °C/60 Min – 99 °C/5 Min – 4 °C/5 Min. Die umgeschriebene cDNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O bis 200  $\mu$ l aufgefüllt und in Aliquots bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### C.2.1.7 cDNA-Array

Die cDNA-Array-Technologie ermöglicht die Analyse der Transkriptexpression vieler Gene in einem Experiment. Dieser Vorteil sollte bei der Verwendung des GEArray<sup>®</sup> Q Serie Pathfinder cDNA-Array ausgenutzt werden, um eine mögliche Beteiligung der beiden Isoformen CP1 und CP2 bei Signaltransduktionswegen aufzudecken. Mittels des GEArray<sup>®</sup> Q Serie Pathfinder cDNA-Array konnten gleichzeitig 96 relevante Zielgene untersucht werden. Dafür wurden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen im subkonfluenten Zustand auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert und die RNA, wie in C.2.1.5 beschrieben, isoliert.

Die cDNA-Sonden mussten vor der Hybridisierung für die anschließende Detektion markiert werden. Hierfür wurde die Methode zum Einbau von Biotin-16-dUTP bei der cDNA-Synthese mittels des AmpoLabeling LPR-Kit gewählt, da diese Technik geringe Hintergrundsignale verursacht. Des Weiteren können durch eine lineare Polymerasereaktion (LPR) auch sehr geringe Mengen von mRNA-Transkripten durch Amplifizierung der Detektion zugänglich gemacht werden. In einem ersten Schritt wurde 5  $\mu$ g total RNA in cDNA umgeschrieben (37 °C/25 Min → 85 °C/5 Min → Eis). In einem zweiten Schritt wurde durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase und einem spezifischen Primermix in jedem Zyklus

der LPR ein Strang Biotin-16-dUTP markierte cDNA hergestellt (85 °C/5 Min; [85 °C/1 Min → 50 °C/1 Min → 72 °C/1 Min] x 30 Zyklen; 72 °C/5 Min). Die Reaktion wurde durch Kochen bei 94 °C für 2 Min gestoppt und die erfolgreiche Markierung vor der folgenden Hybridisierung überprüft.

Während der Herstellung der Biotin-markierten Probe wurde die cDNA-Array-Membran mit Hybridisierungslösung und 100 µg/ml Lachsspermien-DNA bei 60 °C für 2 Std und 10 upm in einem Hybridisierungssofen blockiert. Anschließend wurde der Blockierungslösung die Biotin-16-dUTP markierte cDNA zugegeben und über Nacht bei 60 °C und 10 upm die jeweiligen Sonden hybridisiert.

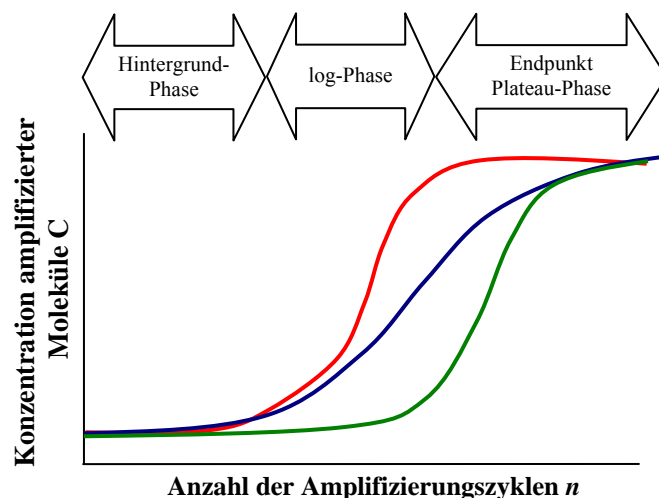
Am folgenden Tag wurde die Membran einmal mit Waschpuffer 1 (2 x SSPE (360 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM EDTA) + 1 % (w/v) SDS) und zweimal mit Waschpuffer 2 (0,1 x SSPE + 0,5 % (w/v) SDS) bei 20 upm und 60 °C für je 15 Min gewaschen.

Die Detektion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase (AP)-markiertem Streptavidin. Hierfür wurde die AP in einem Verhältnis 1 : 8000 verdünnt und für 10 Min mit der Array-Membran inkubiert. Nach viermaligem Waschem erfolgte die Detektion mit der CPD-Star-Lösung und der Belichtung eines Röntgenfilms.

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mit der Software TotalLab densitometrisch ausgewertet. Nach Subtraktion des Hintergrundes wurden die einzelnen Signale auf die *house keeping*-Gene  $\beta$ -Aktin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) bezogen. Für die Analyse der AS-bedingten Unterschiede wurden die Verhältnisse *capn1AS/mock* und *capn2AS/mock* gebildet und nur Werte von  $< 0,5$  (Expressionsverminderung) und/oder  $> 2$  (Expressionserhöhung) für die weitere Bewertung per Definition als signifikant betrachtet und verwendet. Jeder cDNA-Array wurde in Triplikaten durchgeführt.

### C.2.1.8 Quantitative RT-PCR

Die absolute Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels RT-PCR wurde mit dem Light-Cycler-System der Firma Roche durchgeführt. Dieses System erlaubt die PCR-basierte Quantifizierung der Zieltranskripte in Echtzeit durch Analyse der log-Phase einer PCR, in der eine Vermehrung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals einhergeht und somit einer qualitativen Endpunkt-Analyse überlegen ist. Als Signal wird die Zunahme des fluoreszierenden Komplexes aus dsDNA mit interkaliertem SYBR Green detektiert. Jede PCR ist durch drei Phasen gekennzeichnet (Abbildung C.5):



**Abbildung C.5** Schematische Darstellung einer typischen PCR-Amplifizierungsreaktion.

Rote Kurve: hohe Konzentration / hohe Effizienz; Grüne Kurve: geringe Konzentration / hohe Effizienz; Blaue Kurve: hohe Konzentration / geringe Effizienz

- Frühe Phase, bei der die Hintergrundfluoreszenz größer als die Fluoreszenz des PCR-Produktes ist.
- Exponentielle Amplifizierungsphase, die der folgenden Gleichung folgt:

$$C_T = C_0 \times E^n$$

wobei  $C_T$  die Transkriptkonzentration am Wendepunkt,  $C_0$  die Transkript-Startkonzentration,  $E$  die Effizienz der Amplifizierung und  $n$  die Anzahl an Zyklen bis zum Wendepunkt beschreiben.

- Abschließende Plateau-Phase.

Für die Quantifizierung von Nukleinsäureproben unbekannter Konzentration werden Standardkurven mit bekannter Kopienanzahl des Zieltranskripts erstellt (homologer Standard). Die Standardkurve wird dabei mittels linearer Regression durch die Auftragung der Datenpunkte in einem Zyklusnummer ( $n$ ) / Logarithmus der Standardkonzentrationen ( $\log C_T$ ) –Diagramm ermittelt. Die Steigung beschreibt die Kinetik der PCR-Amplifikation. Die PCR-Effizienz kann somit durch die Formel

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

berechnet werden. Im Idealfall ist die Effizienz bei der PCR gleich 2. Weicht dieser Wert nur geringfügig ab, können große Fehler entstehen. So resultiert etwa eine Effizienz von 1,95 bei 30 Detektionszyklen in einen Fehler von 113%. Als Folge müssen für eine genaue Bestimmung der mRNA-Transkriptanzahl mittels RT-PCR die Effizienzen des Standards und der Probe identisch und idealerweise gleich 2 sein.

Für einen Reaktionsansatz wurden 5  $\mu$ l umgeschriebene cDNA bzw. Standard mit 1  $\mu$ l spezifischen Primer und 1  $\mu$ l des *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* Mixes in einem Volumen von 10  $\mu$ l in einer Glaskapillare gemischt, bei 500 x g für 5 Min zentrifugiert und in ein LightCycler Kapillar-Rondell eingesetzt. Die Proben wurden wie folgt behandelt: 95 °C/10 Min; [95 °C/10 Sek  $\rightarrow$  68 °C/10 Sek/58 °C  $\rightarrow$  72 °C/16 Sek] x 35 Zyklen, Fluoreszenzverstärkung 5. Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurvenanalyse mit den Parametern 95 °C  $\rightarrow$  58 °C/10 Sek  $\rightarrow$  dT/dt 0,1 °C/Sek durchgeführt, die es erlaubt, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren. Die Daten wurden anhand der entsprechenden Standardkurven analysiert und zur Normierung auf das *house keeping*-Gen GAPDH bezogen.

## C.2.2 Mikrobiologische Methoden

Die meisten verwendeten mikrobiologische Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Sambrook *et al.* durchgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Abweichende Methoden werden im Einzelnen aufgeführt.

### C.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter XL-10 Gold *E. coli* Zellen

Für die Isolierung einzelner Kolonien wurde ein kleines Volumen XL-10 Gold *E. coli* Zellen auf antibiotikafreien Kultivierungsplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 50 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über eine weitere Nacht kultiviert. Durch Zugabe von frischem LB-Medium wurde die Kultur bei 37 °C geschüttelt bis eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 5000 x g und 4 °C für 10 Min pelletiert und in  $\frac{1}{4}$  Originalvolumen eiskalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspen-

diert sowie für weitere 5 Min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4000 x g, 4 °C, 10 Min) wurden die Zellen in  $\frac{1}{20}$  Orginalvolumen eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für weitere 20 Min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 x g, 4 °C, 10 Min) wurde das Zellpellet in  $\frac{1}{100}$  Orginalvolumen Einfriermedium (85 % (v/v) 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % (v/v) Glycerol) resuspendiert und in 50 µl Aliquots (Glycerol-Stock) bei -80 °C für maximal 4 Monate gelagert.

#### **C.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Stämme**

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Stämme (XL-10, JM110 und Top10) wurde ein Aliquot von 50 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2 µl 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol für 10 Min bei 0 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 300 bis 500 ng des zu transformierenden Plasmides erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 30 Min. Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* Stämme wurde durch einen Hitzeschock für 30 Sek bei 42 °C erzielt. Nachdem die Zellen weitere 2 Min auf Eis inkubierten, wurde den Zellen 450 µl auf 42 °C äquilibriertes SOC [5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM D(+)-Glukose] oder NYZ<sup>+</sup> Medium [10 g/l NZ Amin (Caseinhydrolysat), 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 85 mM NaCl, 12,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM D(+)-Glukose] zugesetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 220 upm geschüttelt. Die Zellsuspension wurde auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

#### **C.2.2.3 Kultivierung und Selektion transformierter *E. coli* Stämme**

##### **C.2.2.3.1 Wachstumsmedien**

Alle Wachstumsmedien (LB und DYT) für die Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurden mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mittels Autoklavieren für 20 Min bei 121 °C und  $1 \times 10^5$  Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Filter keimfrei filtriert und dem Medium zugegeben, nachdem dieses auf 50 °C abgekühlt war. Für die Herstellung solider Kultivierungsplatten wurde das Medium mit 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren vermischt.

##### **C.2.2.3.2 Antibiotika als Selektionsmittel**

Für die Selektion von resistenten *E. coli* Klonen wurden die Medien oder Kultivierungsplatten mit Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Konzentration von 200 µg/ml versetzt. Die Stocklösungen von 200 mg/l wurden bei Ampicillin in 70 % (v/v) Ethanol und bei Kanamycin in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert und bei -20 °C nicht länger als zwei Monate aufbewahrt.

##### **C.2.2.3.3 Beimpfen und Kultivierung von *E. coli* Stämmen**

Für die Isolierung von Plasmiden wurden entweder einzelne rekombinate *E. coli* Kolonien gepickt oder ein geringes Volumen der Glycerol-Stocklösung aus der Stammsammlung in Kulturflaschen mit LB-Medium überführt. Für die selektive Vermehrung der Klone wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 200 µg/ml beigegeben. Die Vermehrung der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 220 upm über Nacht. Am nächsten



Tag wurden die Zellen bei 5000 x g und 4 °C für 10 Min pelletiert und die Plasmid-DNA, wie in Abschnitt C.2.1.1.1 erläutert, isoliert.

#### **C.2.2.3.4 Herstellung und Lagerung der *E. coli* Stammsammlung**

Für die Kurzzeitlagerung (bis zu 4 Wochen) wurden *E. coli* Klone auf Kultivierungsplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Für die Lagerung der *E. coli* Klone über einen längeren Zeitraum in der laboreigenen Stammsammlung wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml Medium über Nacht vermehrt. Nach Zugabe von 15 % (v/v) sterilem Glycerol wurden Aliquots bei -80 °C gelagert. Jeder neue Stamm wurde nummeriert und der Genotyp sowie dessen Eigenschaften wurden in den Stammsammlungskatalog eingetragen.

### **C.2.3 Zellbiologische Methoden**

Die meisten verwendeten zellbiologischen Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Celis durchgeführt (CELIS, 1994). Abweichende Methoden anderen Ursprungs werden einzeln genannt.

#### **C.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Gesunde Zellen in der log-Wachstumsphase wurden für 5 Min bei 400 x g zentrifugiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium (70 % (v/v) DMEM oder RPMI 1640, 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen, gezählt und Aliquote in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 1,8 ml Einfrierröhrchen über Nacht im Isopropanol-Bad bei -70 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurden Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und durch ständiges Schwenken bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden steril in 10 ml auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium gewaschen um das DMSO zu entfernen, und anschließend in einer T25-Zellkulturflasche für bis zu 24 Std im Brutschrank kultiviert.

#### **C.2.3.2 Kultivierung von Säugetierzellen**

Alle Zellen wurden in den Routinewachstumsmedien RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS (für THP-1 Zellen) oder DMEM + 10 % (v/v) FCS (für HeLa- und Hek293-Zellen) ohne Zugabe von Penicillin/Streptomycin-Lösung im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und regelmäßig hinsichtlich einer Mykoplasmen-Kontamination überprüft.

#### **C.2.3.3 Splitten konfluenter Zelllinien**

Um adhärente Zellen zu splitten, wurde das Medium entfernt und die Zellschicht mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine ausreichende Menge Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, so dass diese gerade bedeckt waren. Nach 5 Min bei 37 °C konnten die Zellen durch leichtes Klopfen an das Zellkulturgefäß von der Oberfläche gelöst werden. Durch die Aufnahme der Zellen in 10 ml frischem Medium mit anschließender Zentrifugation von

5 Min und 400 x g wurde die Trypsin-EDTA-Lösung entfernt. Die Zellen wurden erneut in frisches Medium aufgenommen, gezählt und nach Vorgabe in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Suspensionszellen wurden bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert, bevor das verbrauchte Medium mittels Zentrifugieren und Waschen mit PBS entfernt wurde. Die Zellen wurden anschließend in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1 : 5 subkultiviert.

#### C.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Ein Aliquot resuspendierter Zellen wurde mit 0,2 % (w/v) Trypan-Blau versetzt und mit PBS verdünnt, so dass etwa 10 bis 30 Zellen/Quadrat in einem Neubauer Hemocytometer (0,1 µl) sichtbar waren. Hierfür wurde das Neubauer Hemocytometer mit einem befeuchteten Deckglas belegt, bis sich Newton-Ringe bildeten, und anschließend mit 10 µl Zell-Trypan-Blau-Lösung befüllt. Die Anzahl nicht gefärbter und damit lebender Zellen ( $n_{Zellen\_total}$ ) pro Quadrat ( $n_{Quadrat}$ ) wurde unter dem Mikroskop ermittelt und die Konzentration in der Zellsuspension wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{Zellen\_total}}{n_{Quadrat}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde für die Bestimmung der Zelldichte das induktive Messverfahren des Casy Zellzählers ausgenutzt (Partikelgröße). Dabei wurden die Zellen in einer isotonischen Salzlösung in geeigneter Verdünnung resuspendiert und 3 x 400 µl Aliquots analysiert. Die Grenzen wurden durch Zugabe von 50 % (v/v) Ethanol für 30 Min zur Zellsuspension (Zellfragmente, linke Grenze) und Verdopplung des Zell-Durchmessers im *peak*-Maximum (Zelldimere, rechte Grenze) festgelegt.

#### C.2.3.5 Differenzierung und Analyse der Leukämiezelllinie THP-1

Die Differenzierung von Leukämiezelllinien mittels Reagenzien in Richtung Granulozyten- (COLLINS *et al.*, 1978) bzw. Makrophagen-ähnliche Zellen (HUBERMANN & CALLAHAM, 1979) stellt ein etabliertes Modell für die Analyse von Differenzierungsmechanismen dar. Für die Differenzierung der monozytären Zelllinie THP-1 wurde diese in serumfreien RPMI 1640 Medium mit 1 % (v/v) Nutridoma kultiviert. Zur Differenzierung wurden die Zellen für 24 Std mit 80 nM PMA (Makrophagen-ähnlich) oder mit 1 % (v/v) DMSO (Granulozyten-ähnlich) inkubiert. Für die Analyse der stimulierten Zellen wurden u. a. unterschiedliche Differenzierungsmarker gewählt (Tabelle C.3).

**Tabelle C.3** Differenzierungsmarker von Makrophagen- und Granulozyten-ähnlichen Zellen

Makrophagen-ähnlich	Granulozyten-ähnlich
Adhäsion der Zellen	Subzelluläre Kompartimente nach Wright-Giemsa
Vimentin-Expression	CD34-Abnahme*
CD69-Expression*	
CD34-Abnahme*	

\* Die Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe C.2.3.7).

Zur Überprüfung der Bildung von adhärenenten Makrophagen-ähnlichen THP-1-Zellen nach PMA-Stimulierung wurde die Zunahme der Expression von Vimentin mittels Western Blot-Analyse (C.2.4.4) untersucht. Des Weiteren wurde die Zunahme der Expression des Ma-

krophagen-spezifischen Oberflächenmarkers CD69 und die Abnahme des hematopoetischen Vorläuferzellmarkers CD34 anhand der Durchflusszytometrie (C.2.3.6) bestimmt.

Zur Überprüfung der Bildung von Granulozyten-ähnlichen Zellen aus THP-1 wurden DMSO-stimulierte Zellen mittels der Wright-Giemsa-Färbung analysiert. Hierfür wurden die Zellen auf einem Objektträger luftgetrocknet und anschließend für 5 Min mit May-Grünwald-Lösung überschichtet. Anschließend wurden sie mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Giemsa-Lösung behandelt. Nach abschließendem Waschen und Trocknen des Objektträgers wurden die Zellmorphologien mit dem IX70 Phasenkontrastmikroskop der Firma Olympus analysiert. Zudem wurde wie oben beschrieben die Abnahme der Expression von CD34 ermittelt.

### C.2.3.6 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

Für die semiquantitative Bestimmung der Expression bestimmter Oberflächenmarker wurden Zellen in Suspension mittels der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l mit 5  $\mu$ l des entsprechenden Antikörpers oder der jeweiligen Isotypkontrolle für 30 Min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Fluorophor-markierten zweiten Antikörper für wiederum 30 Min bei 4 °C inkubiert. Nach den abschließenden beiden Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in einem Beckman Coulter MCL-XL Durchflusszytometer mit der System II 2.0 Software analysiert. Die Festlegung der jeweiligen *Gates* erfolgte mit Hilfe der entsprechenden Isotypkontrollen. Wurden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen gemessen, mussten die Farben zuvor durch die jeweiligen Einzelfarbkontrollen kompensiert werden. In Tabelle C.4 sind die jeweiligen Filter und verwendeten Fluorophore aufgetragen.

**Tabelle C.4** Filter und verwendete Fluorophore für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenzkanal	Fluorophor	Emissionsfilter [nm]
FL1	FITC, EGFP, EYFP	525 $\pm$ 20
FL2	PE	575 $\pm$ 20
FL3	PI	620 $\pm$ 15

### C.2.3.7 Lipofektion von Plasmid-DNA und siRNA

Das Einschleusen von DNA und RNA in das Zytoplasma eukaryotischer Zellen erfolgte mit Hilfe der kationischen Lipidreagenz Lipofectamine 2000 (LF). Die Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels eines DNA/Lipid-Komplexes wird auch als *Lipofektion* bezeichnet.

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $1 - 5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität in 6well-Platten ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion etwa 80 % Konfluenz erreicht hatten (Tabelle C.5).

**Tabelle C.5** Zelltyp-abhängige DNA-/dsRNA-Menge für die Lipofektion

Zelllinie/-typ	Zellen pro 6well Kavität	$\mu$ g Plasmid DNA	$\mu$ g dsRNA
Hek293 Flp-in T-Rex	$5 \times 10^5$	1	1
HeLa	$3 \times 10^5$	3	n. d. *
mock	$3 \times 10^5$	3	n. d. *
capn1AS	$5 \times 10^5$	3	n. d. *
capn2AS	$2 \times 10^5$	3	n. d. *

\* n. d., nicht durchgeführt

Die Plasmid-DNA bzw. dsRNA wurden in Kulturmedium ohne FCS verdünnt und 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde LF im Verhältnis 2 : 3 (DNA/RNA : LF) zu der DNA- oder RNA-Mischung gegeben. Nach 20 Min Inkubation bei RT wurde der DNA/Lipid-Komplex tropfenweise auf die Zellen aufgebracht und durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt.

### C.2.3.8 Epifluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie

Die kultivierten Säugetierzellen wurden routinemäßig mit einem Olympus IX50 Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Analyse der Epifluoreszenz von Zellen, die mit Fluoreszenzprotein-kodierenden Plasmiden oder pRNAi transfiziert wurden, erfolgte mit einem IX70 Phasenkontrastmikroskop (Olympus), das mit einer UV-Fluoreszenzlampe und mit Fluoreszenzfilter für die in Tabelle C.6 aufgeführten Fluorophore bestückt war.

**Tabelle C.6** *Fluorophore für die Epifluoreszenzmikroskopie*

Fluorophor/Methode	Excitation [nm]	Emission [nm]	Strahlenteiler [nm]
ECFP	436 ± 5	470 ± 515	475 ± 25
EGFP, FITC	490 ± 5	540 ± 40	505 ± 50
EYFP	515 ± 10	555 ± 20	570 ± 50
Propidiumjodid, Rhodamin	535 ± 15	595 LP*	565

\*LP, Langpassfilter

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfusionsproteine von Calpainen bzw. Talin sind in der Abbildung C.6 zusammengefasst.

#### *Calpain-Fluoreszenzfusionsproteine*



#### *Talin-Fluoreszenzfusionsproteine*



**Abbildung C.6** *Fluoreszenzfusionsproteine von Calpainen bzw. Talin für die Epifluoreszenzmikroskopie.*

Schwarze Kreuze bezeichnen die eingeführten Mutationen zur Herstellung von Calpainolyse-sensitiven (Y436P) und -resistenten (L<sup>432</sup>A/Q<sup>433</sup>R/N<sup>437</sup>M, L432G) Talin-EYFP-Varianten.

### C.2.3.9 Protein-Protein Interaktionsstudien

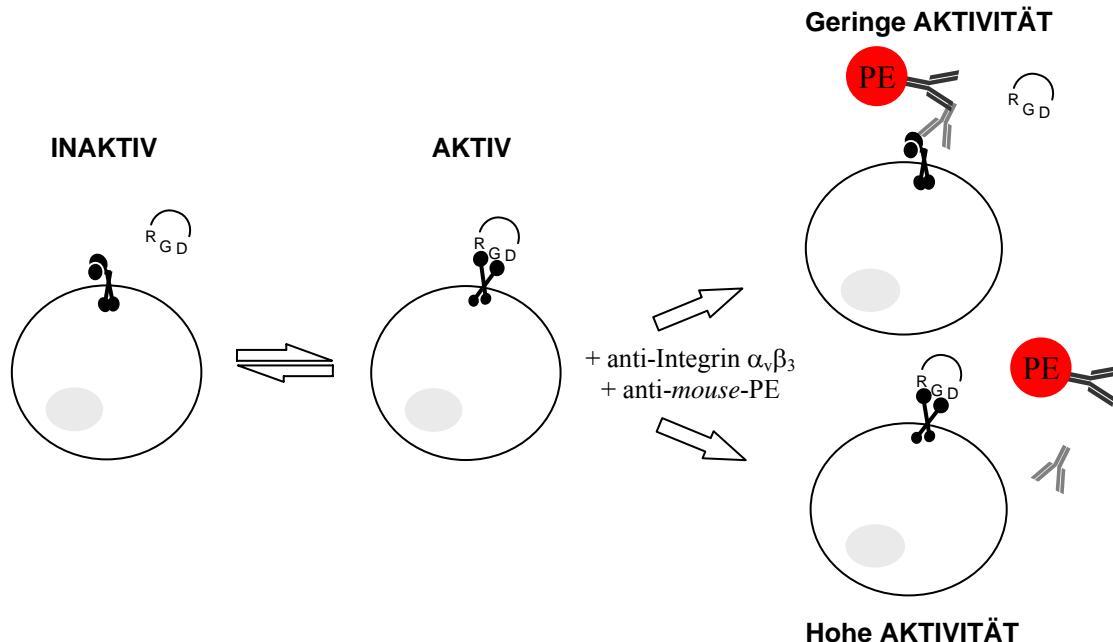
#### C.2.3.9.1 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Zum Nachweis einer Kolo-kalisation von Proteinen in der Zelle wurden konfokale *Laserscanning*-Aufnahmen am Institut von Prof. Dr. Angelika Vollmar in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Zahler (Institut für Pharmazie, LMU München) an einem Axiovert 200M/510Meta *Laserscanning*-System mit einem 63x/1,4 Objektiv durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der *Laserscanning*-Mikroskopie-Software von der Firma Carl Zeiss erfasst und die Bilder anschließend mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet.

#### C.2.3.9.2 Bestimmung der Liganden-Bindungsaffinität von Integrin $\alpha_v\beta_3$

Um das Maß für die Liganden-Bindungsaffinität mit der Aktivität des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  gleichsetzen zu können, wurde die kompetitive Bindung eines monoklonalen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers und eines zyklischen RGD-Peptides gemessen. Ähnliche Studien wurden bereits bei der Analyse von Aktivierungsmechanismen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durchgeführt (FRANCO *et al.*, 2004; CALDERWOOD *et al.*, 2002).

In Abbildung C.7 ist die Versuchsabfolge für die Bestimmung der Liganden-Bindungsaffinität des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  wiedergegeben. Je größer dabei die Affinität des RGD-Peptides zu dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ist, desto geringer ist die kompetitive Verdrängung mit dem monoklonalen Antikörper LM609 gegen den Vitronektin-Rezeptor. Leicht zu „aktivierende“ Integrine  $\alpha_v\beta_3$  haben eine größere Affinität, das RGD-Peptid als den Antikörper LM609 zu binden (DORMOND *et al.*, 2004).



**Abbildung C.7** Versuchsablauf zur Bestimmung der Liganden-Bindungsaffinität von Integrin  $\alpha_v\beta_3$ .

$5 \times 10^4$  Zellen wurden mit der entsprechenden Konzentration an zyklischem RGD-Peptid oder RAD-Peptid (Negativkontrolle) zur Bestimmung von aktivem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  inkubiert. Aktives Integrin  $\alpha_v\beta_3$  wurde mit dem Antikörpergemisch anti-Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und anti-mouse-PE markiert und anschließend im Durchflusszytometer im Kanal FL3 nach vorheriger Festlegung der Messparameter analysiert. Weitere Details siehe Text.

Die Zelllinien *mock* und *capn2AS* wurden schonend mit Accutase von der Zellkulturplatte abgelöst und zweimal mit PUCKs Salzlösung (5,4 mM KCl, 136 mM NaCl, 4,1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,6 mM D-Glukose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>) gewaschen. Anschließend wurden für jede Messung  $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl PUCK resuspendiert und mit 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 oder 10,0 µM zyklischem RAD- oder RGD-Peptid für 30 Min auf Eis bei 30 upm inkubiert. Ungebundenes Peptid wurde durch zweimaliges Waschen mit PUCKs Salzlösung entfernt. Nach der Zugabe von 1 µg Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper wurden die Zellen weitere 30 Min auf Eis mäßig geschüttelt. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PUCK eliminiert und die Zellen anschließend mit 3 µl anti-*mouse*-PE (30 Min, RT) für die folgende Messung markiert. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit 4 %iger Paraformaldehyd-lösung [4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS] fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Bestimmung der relativen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Bindung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{relative Integrin } \alpha_v\beta_3\text{-Bindung} = \left( \frac{\log[RGD]}{RFU_{RGD}} - \frac{\log[RAD]}{RFU_{RAD}} \right) \times \frac{1}{mg Protein_{Total}}$$

In einem  $\log[RGD/RAD]$ - $RFU$ -Diagramm wurden die Werte der gemessenen relativen PE-Fluoreszenz-Einheiten ( $RFU$ ) gegen den Logarithmus der jeweiligen RAD- oder RGD-Peptid-Konzentrationen aufgetragen. Dabei wurde die  $RFU$  bei 0 µM Peptid als 100 % definiert. Der Hintergrund der Messung wurde durch Abzug der Steigung von der Kontrolle (RGD) berücksichtigt. Abschließend wurde der relative Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Bindungswert von *capn2AS* als Vielfaches von *mock* angegeben.

### C.2.3.10 Apoptose-Studien

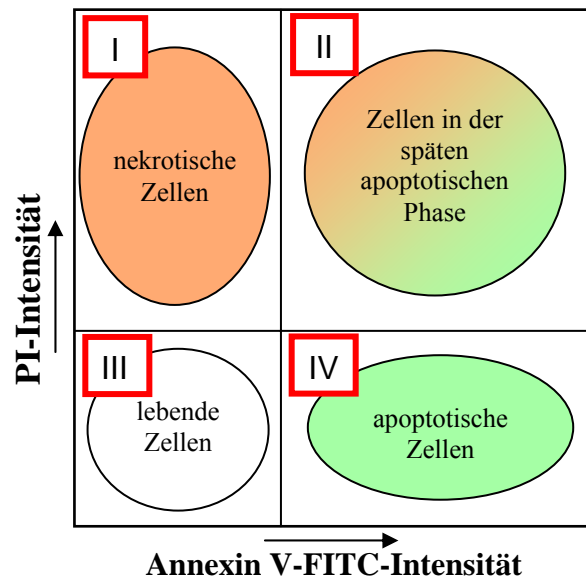
#### C.2.3.10.1 Nuklearkondensation von ECFP-H2Ai transfizierten AS-Zellen

(modifiziert nach GIL-PARRADO *et al.*, 2002)

Transient ECFP-H2Ai (ECFP-Histon 2A-Fusionsprotein, hergestellt von Dr. Eberhard Spieß) exprimierende *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurden mit 10 µM Ionomycin für 210 Min inkubiert, um die Apoptose einzuleiten. Für die mikroskopischen Versuche wurden die Zellen in Hepes Medium bei 37 °C in einer Perfusions-Kammer (POC) inkubiert und alle 30 Min Bilder mit einem ECFP-Filter (Tabelle C.6) zur Visualisierung der Zellkerne mittels ECFP-H2Ai aufgenommen. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

#### C.2.3.10.2 Unterscheidung von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie

Zur Klärung, inwieweit eingeführte Transkripte Apoptose und/oder Nekrose induzieren wurden transfizierte und nicht-transfizierte Zellen für die Messung im Durchflusszytometer gefärbt. Dabei wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit 5 µl Annexin V-FITC (Annexin V bindet Phosphatidylserin, welches bei Apoptose auf die extrazelluläre Seite der Membran transloziert wird) und 10 µl Propidiumjodid (PI)-Lösung (Interkalierung des membranundurchlässigen Halogenwasserstoffs mit DNA ist ein Anzeichen für Nekrose) in 100 µl PBS für 30 Min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Kompensation der beiden Farben und Festlegung der *Gates* erfolgte nach Messung der Kontrollen für Apoptose (100 µM Etoposide, 24 Std) und Nekrose (70 % (v/v) Ethanol, 1 Std). Die Analyse der apoptotisch-nekrotischen Zellen erfolgte über die gleichzeitige Messung der Fluoreszenzen von FITC und PI (Tabelle C.4) von  $2 \times 10^4$  Zellen im Durchflusszytometer (Abbildung C.8). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.



**Abbildung C.8 Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer und nekrotischer Zellen.**

Die Färbung einer heterogenen Zellpopulation mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) erlaubt die Unterscheidung zwischen nekrotischen Zellen (I), Zellen in der späten apoptotischen Phase (II), lebenden Zellen (III) und apoptotischen Zellen (IV).

### C.2.3.10.3 Bestimmung der Zytotoxizität von Ionomycin

Um die spezifische Ionomycin-Konzentration zu ermitteln, die notwendig ist, Apoptose bei *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen zu induzieren, ohne dass dabei die Vitalität der Zellen durch Nebeneffekte beeinflusst wird, wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/Kavität in 24well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 oder 15,0  $\mu\text{M}$  Ionomycin für eine Std inkubiert, anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Färbelösung (1 mg/ml Propidiumjodid in PBS) gefärbt und im Fluoreszenzreader (Safire 2) bei einer Excitationswellenlänge von  $530 \pm 10$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $625 \pm 10$  nm analysiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Lysispuffer [1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) NP40 in PBS] versetzt. Die einzelnen Werte wurden auf diese Positivkontrolle bezogen.

### C.2.3.11 Bestimmung der Calpain- und Caspase-Aktivität in lebenden Zellen (modifiziert nach GIL-PARRADO *et al.*, 2002)

Für die Bestimmung der basalen und induzierten spezifischen intrazellulären Proteasenaktivität wurde für Calpain die Hydrolyse des zellgängigen Substrates Suc-LLVY-NHMec (GUTTMANN *et al.*, 1998) oder für Caspase 3/7 die Hydrolyse von Suc-DEVD-NHMec (NICHOLSON *et al.*, 1995) gemessen. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden  $5 \times 10^4$  transfizierte oder untransfizierte Zellen pro Kavität in 24well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Substrat in serumfreiem Hepes-gepufferten Medium ohne Phenolrot bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  für eine Std präinkubiert. Zur Kontrolle der spezifischen Hydrolyse wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit 50  $\mu\text{M}$  spezifischem Calpain-Inhibitor CP1B oder 20  $\mu\text{M}$  spezifischem Caspase 3/7-Inhibitor Z-DEVD-FMK präinkubiert. Zur Induktion der Calpain-Aktivität bzw. der Apoptose (GIL PARRADO *et al.*, 2002) wurde zu den Zellen 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin direkt vor der Messung zugegeben. Die Hydrolyse der Substrate wurde in einem Safire 2 Fluoreszenzanalysensystem bei der Excitationswellenlänge  $365 \pm 5$  nm und bei einer Emissionswellenlänge  $432 \pm 5$  nm über zwei Std gemessen. Anschließend wurden die Zellen in Lysispuffer [50 mM Hepes/KOH, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP40, pH 7,4] für zwei Std bei RT inkubiert, um die Gesamtproteinkonzentration ( $\text{mg Protein}_{\text{Total}}$ ) pro Kavität zu bestimmen. Für

die Berechnung der spezifischen Aktivität von Calpain sowie von Caspase 3/7 wurde von der konstanten Zunahme der NHMec-Fluoreszenz ( $dF_{NHMec0}$ ) über die Zeit ( $dt$ ) die konstante Zunahme der NHMec-Fluoreszenz in Gegenwart der spezifischen Inhibitoren CP1B und Z-DEVD-FMK ( $dF_{NHMecInh}$ ) über den gleichen Zeitraum subtrahiert und entsprechend nachfolgender Gleichung auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen:

$$\text{spezifische Aktivität} = \left( \frac{dF_{NHMec0} - dF_{NHMecInh}}{dt} \right) \times \frac{1}{mgProtein_{Total}}$$

### C.2.3.12 Zellmigrationsstudien

Anhand verschiedener Tests wurde versucht, den komplexen Vorgang der Zellmigration in einfachen Modellen zu analysieren. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen Zellmigrationsstudien entlang einer zweidimensionalen Oberfläche (2D) und Zelltransmigrationsstudien, bei der Zellen durch eine rekonstituierte Matrix hindurch wandern (3D).

#### C.2.3.12.1 Bestimmung der Zellmigration

##### **Fluoreszenz-basierter Migrationsassay**

Der *Cell Motility HitKit* von Cellomics beruht auf der Visualisierung und direkten Quantifizierung von Zellbewegungen durch die Bestimmung der Spurgröße einer migrierenden Zelle. Die Spurgröße ist proportional zum Betrag der Beweglichkeit der Zellen. Dabei wurden 500 lebende nicht-transfizierte oder transfizierte Zellen mit oder ohne Stimulus direkt auf blaue fluoreszierende *beads* in eine 96well-Zellkulturplatte plattiert, wobei die *beads* während der Zellbewegung phagozytiert und/oder beiseite geschoben wurden. Nach 24 Std wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert sowie das F-Aktin-Zytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Anschließend wurde die Platte im Fluoreszenzanalysensystem bei den Excitations- und Emissionswellenlängen  $355 \pm 10$  nm bzw.  $400 \pm 10$  nm (blaue *beads*) sowie  $542 \pm 10$  nm bzw.  $565 \pm 10$  nm (Rhodamin-Phalloidin) gemessen. Die relative Migration konnte wie folgt bestimmt werden:

$$\text{relative Migration} = \frac{F_{B0} - F_B}{F_R \times N_{\text{transfiziert}}}$$

Dabei kann die Spurgröße durch Subtraktion der gemessenen blauen Fluoreszenz der jeweiligen Ansätze ( $F_B$ ) von der basalen blauen Fluoreszenz einer Kavität ohne Zellen ( $F_{B0}$ ) berechnet werden. Die Spurgröße wurde anschließend auf die Anzahl der Zellen ( $F_R$ ) oder im Fall transfizierter Zellen auf den prozentualen Anteil bezogen. Der prozentuale Anteil transfizierter Zellen ( $N_{\text{transfiziert}}$ ) wurde dabei mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abschließend wurde der Wert der relativen Migration durch Quotientenbildung mit der jeweiligen Kontrolle erhalten.

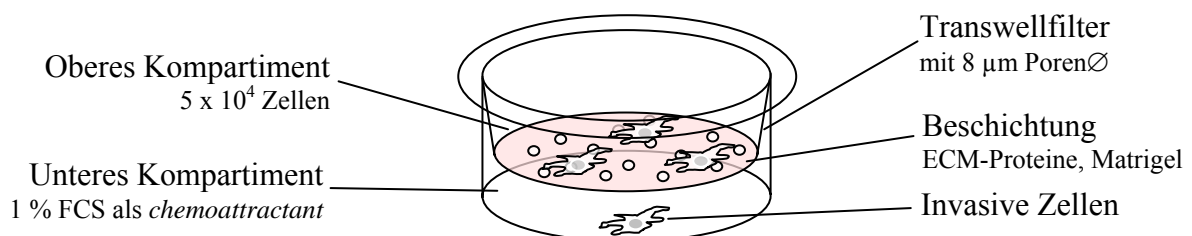
##### **Zeitversetzte Videomikroskopie**

Für die Echtzeit-Beobachtung der Zellmigration über Oberflächen wurden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen auf Glasobjektträger ausgesät und am folgenden Tag transient mit dem Vektor pECFP+H2Ai transfiziert. Nach weiteren 24 Std wurde der Glasobjektträger in eine POC-Kammer überführt und die Zellen mit Hepes-Medium überschichtet. Die POC-Kammer wurde in einen Heizrahmen auf dem Olympus IX70-System eingespannt. Alle 15 Min wurde von den Zellen über einen Zeitraum von 15 Std mit einem 40x Objektiv und der Anregungswellenlänge für ECFP (siehe Tabelle C.6) ein Bild aufgenommen. Zur Analyse der Echtzeitmikroskopie mit der ImagePro Software wurden die Positionen der Zellkerne markiert.



### C.2.3.12.2 Bestimmung der Transmigration (modifiziert nach ZANG *et al.*, 2000)

Für die Untersuchung der Transmigrationskapazität wurde in einer Boyden-Kammer mit zwei getrennten Kompartimenten die Wanderung von Zellen durch eine beschichtete Filtermembran mit definierter Porengröße in Richtung eines Stimulus untersucht. Zur Bestimmung der Fähigkeit durch eine rekonstituierte Matrix (Matrigel) oder durch einzelne ECM-Proteine in Richtung eines 1 %igen FCS-Gradienten zu transmigrieren, wurden  $5 \times 10^4$  Zellen (konfluent) auf zuvor beschichtete Filtermembranen (6,5 mm Ø, 8 µm PorenØ) in das obere Kompartiment gegeben (Abbildung C.9). Die Membranen wurden entweder mit 20 µg Matrigel oder 0,5 µg Vitronektin, Fibronektin, Laminin oder Kollagen IV – resuspendiert in entsprechendem Medium (RPMI 1640 und DMEM) mit 1 % Nutridoma – über Nacht beschichtet. Im Fall der einzelnen ECM-Proteine wurden diese anschließend mit 3 % (w/v) BSA in PBS für eine Stunde blockiert. Die Zellen waren während der Versuchsdauer von 24 Std nicht in der Lage in serumfreiem Medium zu proliferieren. Die Vitalität der Zellen wurde routinemäßig nach der Versuchszeit mittels Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Dabei lag der Anteil toter Zellen unter 5 %. Für die Auswertung der Transmigration wurde die Anzahl an Zellen des unteren Kompartimentes bestimmt: Im Fall von unbehandelten THP-1 Zellen wurden die transmigrierten Zellen im Medium des unteren Kompartiments gesammelt und die Zellzahl, wie in Kapitel C.2.3.4 beschrieben, bestimmt. Bei der Analyse von adhären Zellen (mit PMA stimulierte THP-1-Zellen sowie *nsRNAi*-, *capn1RNAi*-, *capn2RNAi*-, *capn4RNAi*-, *capn1/capn4RNAi*-, *capn2/capn4RNAi*-, *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen) wurden die nicht transmigrierten Zellen im oberen Kompartiment mit einem Wattetip entfernt und das Medium im unteren Kompartiment gesammelt. Die transmigrierten, auf der Unterseite der Filtermembran adhären Zellen wurden mit 1 %ige Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und anschließend mikroskopisch überprüft. Dafür wurden die Zellen im zuvor gesammelten Medium des unteren Kompartimentes aufgenommen und die Anzahl lebender Zellen bestimmt.



**Abbildung C.9 Transmigrations-Assay durch einen beschichteten Filter in einer Boyden-Kammer.**

Unbehandelte, stimulierte oder transfizierte Zellen wurden auf eine mit 20 µg Matrigel oder 0,5 µg Vitronektin, Fibronektin, Laminin oder Kollagen IV beschichtete Membran ausgesät. Die Zellen, die innerhalb 24 Std in Richtung des 1 %igen FCS-Gradienten transmigrierten, wurden anschließend quantifiziert und die Anzahl der transmigrierten Zellen auf die jeweilige Kontrolle normiert.

Für die Berechnung der relativen Transmigration von unstimulierten und stimulierten THP-1-Zellen sowie von *mock*-, *capn1AS*-, *capn2AS*-, *nsRNAi*-, *capn1RNAi*-, *capn2RNAi*-, *capn4RNAi*-, *capn1/capn4RNAi*- und *capn2/capn4RNAi*-Zellen wurde die Anzahl transmigrierter stimulierter Zellen ( $N$ ) in Bezug zu transmigrierter Kontrollzellen ( $N_{\text{Kontrolle}}$ ) ohne Stimulation gesetzt:

$$\text{relative Transmigration} = \frac{N}{N_{\text{Kontrolle}}}$$

Im Fall der Transmigrationsstudien von mit Talin-EYFP-Konstrukten transfizierten *mock*- und *capn2AS*-Zellen wurde zusätzlich die Transfektionseffizienz ( $N_{\text{transfiziert}}$ ) für die Bestimmung der relativen Transmigration berücksichtigt, da bei diesen Versuchsreihen die Transfektionseffizienzen mit den unterschiedlichen Plasmiden heterogen verteilt waren:

$$\text{relative Transmigration} = \frac{N}{N_{\text{Kontrolle}} \times N_{\text{transfiziert}}}$$

Für die Gelatinezymographie (C.2.4.8) wurden durch Zentrifugation des Mediums vom oberen Kompartiment nicht-adhärenente Zellen abgetrennt und die Überstände anschließend bei -80 °C bis zur Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität eingefroren.

### C.2.3.13 Zellzyklus- und Proliferationsstudien

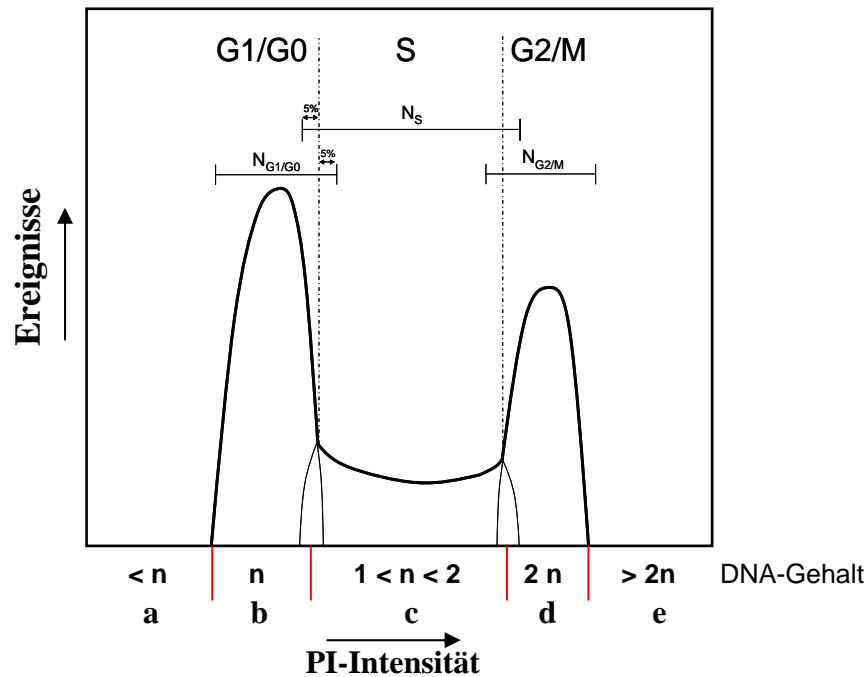
#### C.2.3.13.1 Zellsynchronisierung mittels *Mitotic-shake-off* (modifiziert nach LINDL, 2002)

Für Zellzyklusanalysen müssen heterogene Zellkulturpopulationen synchronisiert werden. Hierfür wurden Zellen der mitotischen Phase mittels Abschütteln gewonnen (*Mitotic-shake-off*). Um mitotische HeLa (*mock*, *capn1AS* und *capn2AS*)-Zellen mit hoher Ausbeute zu erhalten, wurden diese bei 70 – 80 % Konfluenz mit 0,5 %ige Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml für 6 Std in eine neue Zellkulturflasche gegeben und anschließend das Medium gewechselt. Nach weiteren 10 Std wurden die mitotischen Zellen durch leichtes Schütteln geerntet und für die folgenden Versuche vorbereitet.

#### C.2.3.13.2 Zellzyklus-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte nach Fixierung von  $5 \times 10^4$  Zellen in 4 Vol abs. Ethanol über Nacht bei 4 °C. Zur Entfernung des Ethanols wurden die Zellen vor der Färbung mit Propidiumjodid (PI) bei 1000 x g für 5 Min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl Färbelösung (1 mg/ml PI, 200 µg/ml DNase-freie RNase A in PBS) für 30 Min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

Die einzelnen Zellzyklusphasen konnten nach ihrem DNA-Gehalt (Propidiumjodid interkaliert in DNA) bestimmt werden: Zellen in der G1/G0-Phase ( $n$ , einfacher Chromosomensatz), Zellen in der S-Phase ( $1 < n < 2$ , Verdopplung des Chromosomensatzes), G2/M-Phase ( $2n$ , doppelter Chromosomensatz). Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Annäherungsmethode von Celis (CELIS, 1994), bei der 5 % an Zellen zum sichtbaren Schnittpunkt der einzelnen Populationen addiert wurden, da die Grenzen zwischen den einzelnen Phasen durch diese einparametrische Zellzyklusbestimmungsmethode mittels PI nicht eindeutig festgelegt werden können (Abbildung C.10). Zusätzlich kann in dieser Analyse der prozentuale Anteil von toten Zellen als sub-G1-Population ( $< n$ , fragmentierte DNA) und Zellaggregate ( $> 2n$ ) bestimmt werden.



**Abbildung C.10 Parameter für die Bestimmung der Populationen in den einzelnen Zellzyklusphasen.**

Die Quantifizierung erfolgte nach Celis (CELIS, 1994): Zu den mit Ethanol fixierten und PI gefärbten Zellen in der G1/G0-Phase (b:  $n$ ), Zellen in der S-Phase (c:  $1 < n < 2$ ), G2/M-Phase (d:  $2n$ ) wurden näherungsweise 5 % an Zellen dazugezählt. Zusätzlich können bei diesem Messverfahren die Anteile toter Zellen (a:  $< n$ ) und Zellaggregate (e:  $> 2n$ ) bestimmt werden.

### C.2.3.13.3 Bestimmung der Zellproliferation

Für die Bestimmung der Proliferation wurden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>,  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> oder  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24well Platten ausgesät. In einen Zeitraum von fünf Tagen wurden die Zellen alle 24 Std im CASY-Zellzähl-system analysiert (siehe Kapitel C.2.3.4). Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

## C.2.4 Proteinchemische Methoden

### C.2.4.1 Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen (modifiziert nach GIL-PARRADO *et al.*, 2003)

Adhärent wachsende Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit  $1 \times$  Trypsin-EDTA vom Kulturgefäß abgelöst. Suspensionszellen wurden bei  $400 \times g$  für 5 Min sedimentiert und ebenfalls zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpräzipitat wurde in zwei Vol hypotonischem Lysispuffer [10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 % (v/v) Proteaseninhibitor-Cocktail, pH 7,9] resuspendiert und für 5 Sek mit einer Ultraschalllanze auf Eis lysiert. Die unlöslichen Membran- und Zytoskelettbestandteile wurden bei 16200 upm für 10 Min bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde als zytoplasmatisches Lysat gesammelt und das Sediment in 1 Vol Membranlysispuffer [300 mM Hepes, 1,4 M KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) NP40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 % (v/v) Proteaseninhibitor-Cocktail, pH 7,9] aufgenommen, für 5 Sek mit einer Ultraschalllanze auf Eis homogenisiert und anschließend für 30 Min bei 16200 upm zentrifugiert.

#### **C.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration** (modifiziert nach SMITH *et al.*, 1985)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die colorimetrische BCA-Methode verwendet. Dabei wird die Entstehung eines blauen  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes gemessen, der sich zwischen Peptidbindungen und Bicinchoninicsäure (BCA) in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  bildet.

Dafür wurden 100  $\mu\text{l}$  Lysat in geeigneter Verdünnung mit 100  $\mu\text{l}$  BCA/ $\text{Cu}^{2+}$  (24 : 1)-Lösung pro Kavität in einer 96well-Platte versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37 °C für 1 Std inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Standardkurve mit BSA-Standardlösungen bekannter Konzentrationen verwendet. Die Bestimmung der Proben erfolgte in Duplikaten.

#### **C.2.4.3 Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse**

##### **C.2.4.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung von Proteinen komplexer Lysatgemische wurde die „diskontinuierliche Elektrophorese“ (LAEMMLI, 1970) verwendet. Durch die Gegenwart von SDS in den Gelen ist die Denaturierung und negative Ladung der Proteine sichergestellt, so dass die Auftrennung nur in Abhängigkeit von der Molekularmasse erfolgt. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurden entweder homogene Gele mit 7,5 % (bis 50 kDa), 10 % (40 bis 120 kDa), 12,5 % Acrylamid (ab 80 kDa) oder Gradientengele mit 4 – 20 % Acrylamid verwendet.

Nach Zugabe des Probenpuffers [250 mM Tris/HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) Coomassie Blue G, 10 % (w/v) DTT, pH 6,8] zu der Probe wurden diese 5 Min bei 95 °C gekocht und anschließend 10 Sek bei 5000 upm zentrifugiert. Die Elektrophorese des Gels wurde in Laufpuffer [25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25] bis zur Trennung der Proteine bei 125 V durchgeführt. Zur Charakterisierung der Banden wurden ein Farbstoff-markierter Molekulargewichtsmarker und ggf. gereinigte Zielproteine ebenfalls der Elektrophorese zugeführt.

##### **C.2.4.3.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran** (modifiziert nach GERSHONI & PALADE, 1983).

Für die immunologische Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe eines *semi-dry* Elektrotransfer-Verfahrens transferriert.

Für den Transfer wurden 12 Whatmann Filterpapiere (1 mm) und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel, die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden in Transblotpuffer (50 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,13 mM SDS, 20 % (v/v) Ethanol) für 5 Min inkubiert und anschließend das „Transfersandwich“ wie folgt aufgebaut: ANODE – 6 Filterpapiere – Nitrozellulosemembran – Gel – 6 Filterpapiere – KATHODE. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 200 mA für 1,5 bis 3 Std, je nach Molekulargewicht des Zielproteins. Die Effizienz des Transfers wurde durch die Färbung der Membran nach dem Blot mit 2 % (w/v) Ponceau Rot S in Trichloressigsäure überprüft.

**C.2.4.3.3 Immundetektion der Zielproteine**

(modifiziert nach GERSHONI &amp; PALADE, 1983).

Zur Immundetektion der Zielgene wurden die in Tabelle C.7 aufgeführten Antikörper und HRP-Konjugate in den entsprechenden Verdünnungen verwendet.

**Tabelle C.7** *Verwendete Antikörper und Verdünnungen*

<b>1. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>2. Antikörper (HRP-Konjugate)</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Aktin	1 : 400	anti-mouse	1 : 10000
anti-Talin	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-Calpain <i>small subunit</i>	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-m-Calpain	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-m-Calpain (Tripple P.)	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti- $\mu$ -Calpain	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-Calpastatin	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-Vimentin	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-RhoA	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-MMP-2	1 : 500	anti-mouse	1 : 10000
anti-MMP-9	1 : 500	anti-mouse	1 : 10000
anti-Grb2	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-Ras	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-Caspase 9	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-p53	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-NF $\kappa$ B p65	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-PKC $\alpha$ / $\beta$ II	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-P-PKC $\alpha$ / $\beta$ II	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-Ezrin	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-Vinculin	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-FAK	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-GFP	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-Rac1	1 : 500	anti-rabbit	1 : 20000
anti-Cdc42	1 : 500	anti-sheep	1 : 5000
anti-ERK2	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-P-ERK1/2	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-MEK1/2	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-P-MEK1/2	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 20000
anti-Cyclin D1	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-Cyclin D2	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-Cyclin D3	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-CDK4	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-P-Rb (Ser <sup>780</sup> )	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-P-Rb (Ser <sup>249</sup> /Thr <sup>251</sup> )	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-p15 <sup>Ink4B</sup>	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-p19 <sup>Ink4D</sup>	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000
anti-p21 <sup>Cip1</sup>	1 : 1000	anti-mouse	1 : 10000
anti-p27 <sup>Kip1</sup>	1 : 1000	anti-rabbit	1 : 10000

(die genaue Bezeichnung und Herkunft der Antikörper bzw. HRP-Konjugate ist in C.1.4 angegeben)

Vor der Detektion wurden die Banden des Molekulargewichtsmarkers auf der Nitrozellulosemembran markiert und diese anschließend in TBST (20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 (v/v), pH 7,6) mit 3 % BSA (w/v) für eine Std bei RT und 60 upm zur Blockierung der freien Bindungsstellen inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle C.7) in TBST über Nacht bei 4 °C und 60 upm zur Bindung an das Zielprotein inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit TBST gewegewaschen (3 x 10 Min). Der zweite Antikörper, markiert mit *horseradish peroxidase* (HRP), wurde in TBST verdünnt und für eine Std auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach der zweiten Inkubationsphase wurde der ungebundene zweite Antikörper mit TBST entfernt (3 x 10 Min). Die Detektion der Banden erfolgte nach Zugabe einer Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und Belichtung eines Röntgenfilms.

#### C.2.4.4 Bestimmung der endogenen Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Proteinexpression in fixierten Zellen wurden  $1 \times 10^4$  Zellen/ml auf unbeschichtete sowie auf Fibronectin- oder Vitronectin-beschichtete (2 µg/ml) Glasobjektträger ausgesät. Nach 24 Std wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Fixierungslösung [3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS] für 20 Min bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit Permeabilisierungslösung [0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS] für fünf Min überschichtet und anschließend mit Blockierungslösung [4 % (w/v) BSA in PBS] für eine Std behandelt. Die entsprechenden Antikörper wurden in geeigneter Verdünnung (*mouse anti-µ-Calpain* 1 : 40; *rabbit anti-m-Calpain* 1 : 40; *mouse anti-Calpain small subunit* 1 : 80; *mouse anti-Talin* 1 : 40; *mouse anti-MMP-2*, 1 : 40) in Blockierungslösung verdünnt und für eine weitere Std auf die Zellen gegeben. Nach fünf Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit dem jeweiligen Fluoreszenzkonjugat (*goat anti-mouse* Alexa488, *chicken anti-rabbit* Alexa488, *goat anti-mouse* Alexa633, *chicken anti-rabbit* Alexa633) in einer Verdünnung von 1 : 200 in Blockierungslösung für eine Std mit den Zellen inkubiert. Ungebundenes Konjugat wurde durch fünfmaliges Waschen entfernt, die Zellen mit Mowiol beschichtet und, wie in Kapitel C.2.3.8 und C.2.3.9.1 beschrieben, mikroskopisch analysiert.

#### C.2.4.5 Bestimmung der Calpain-Aktivität mittels Caseinzymographie (modifiziert nach RASER *et al.*, 1995)

Zur Bestimmung der Calpain-Aktivität in Zelllysaten, wurden die Proben in einer nativen PAGE aufgetrennt. Da jedoch durch die fehlende Denaturierung und die Einbindung von Casein in das Gel die Proteine nicht nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden, wurden als Positivkontrolle gereinigtes µCP und mCP mit aufgetragen. Nach Zugabe des Ladepuffers [150 mM Tris/HCl, 20 % (w/v) Glycerin, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 6,8] erfolgte die elektrophoretische Trennung bei 4 °C unter Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> (Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 8,3). Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Gel unter mehrmaligem Wechsel des Aktivierungspuffers (20 mM Tris/HCl, 10 mM DTT, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) über Nacht bei RT und 60 upm geschüttelt. In einem Parallelansatz wurde dem Aktivierungspuffer 20 mM EDTA zugesetzt, um die Calpain-spezifische Hydrolyse des Substrates Casein zu überprüfen. Am Folgetag wurde das Gel mit einer Lösung von 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig fixiert, mit Coomassieblau gefärbt und anschließend mit 10 % (v/v) Eisessig entfärbt.

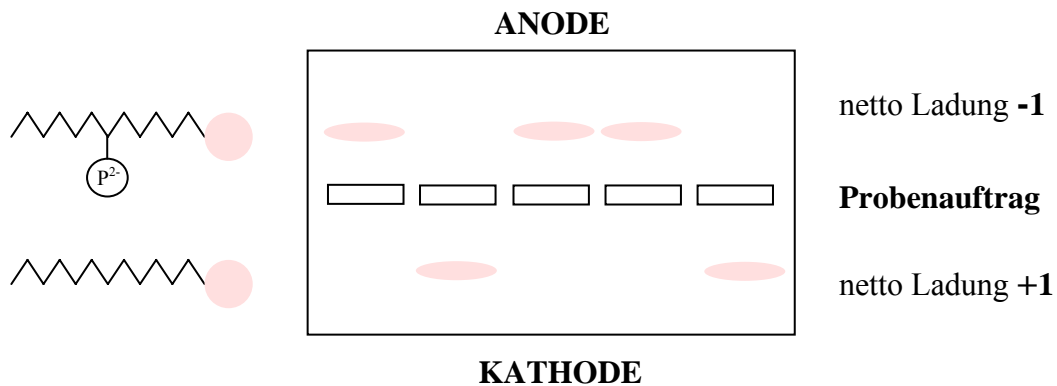
#### C.2.4.6 Bestimmung der MMP-Aktivität mittels Gelatinezymographie (modifiziert nach JOHANSON & SMEDSROD, 1986)

Für die Bestimmung der MMP-Aktivität in Zellkulturüberständen als Maß für freigesetzte Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) wurde das Novex System (Invitrogen) verwendet.

Zellkulturüberstände einer definierten Anzahl von Zellen wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE [10 % (w/v) (Acrylamid) Tris/Glycin Gel mit 0,1 % (w/v) Gelatine] elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für 30 Min in 2,5 % (v/v) Triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O renaturiert. Die Aktivierung der Proteasen erfolgte bei 37 °C und 60 upm über Nacht in Aktivierungspuffer [Tris/Base 10 mM, Tris/HCl 40 mM, 200 NaCl mM, 5 CaCl<sub>2</sub>, Brij 0,2 % (w/v), pH 8,3]. Als Positivkontrolle wurde der Überstand von mit PMA stimulierten HT1080-Zellen (RIES *et al.*, 1996) aufgetragen. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Färbung mit Färbelösung [30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,5 % (w/v) Coomassie R-250] für 30 Min. Die Entfärbung wurde mittels einer Entfärberlösung [30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig] durchgeführt, bis klare Banden als Anzeichen für die proteolytische Aktivität sichtbar wurden.

#### C.2.4.7 Bestimmung der *pan* PKC-Aktivität

Zur Bestimmung der *pan* PKC-Aktivität in Zelllysaten wurde der nicht-radioaktive Assay PepTag der Firma Promega verwendet. Dabei wird die Phosphorylierung des Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen PKC Substrat-Peptids PLSRTLVAALK und die damit verbundene Änderung der Netto-Ladung des Peptids von +1 zu -1 verfolgt (Abbildung C.11).



**Abbildung C.11 Schematische Darstellung des *pan* PKC-Aktivitäts-Assays.**

Das fluorogene spezifische PKC-Peptid-Substrat besitzt die Nettoladung +1. Durch Phosphorylierung ändert sich die Nettoladung zu -1. Die beiden unterschiedlich geladenen Peptide werden anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Hierfür wurden Zellen mit Phosphataseinhibitoren-haltigem Puffer [20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Glycerophosphat, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Natriumfluorid, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail, pH 7,4] lysiert und in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 2 µg Peptid sowie einer Phospholipidlösung im entsprechenden Puffer verdünnt und für 30 Min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Kochen bei 95 °C für 10 Min gestoppt und in einem 0,8 % (w/v) Agarosegel in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mittels eines Transilluminators und einer CCD-Kamera dokumentiert und ausgewertet.

## D Ergebnisse

### D.1 Down-Regulierung der Calpain-Expression und Zellfunktionsanalysen

Für die Analyse der Beteiligung von Calpainen, speziell von  $\mu$ CP und mCP, bei diversen Zellfunktionen wie etwa dem Proliferationsvermögen, der Apoptoseempfindlichkeit, der Zellzyklusprogression, der Signaltransduktion sowie insbesondere dem Zellmigrationsverhalten bedarf es der spezifischen Regulierung der Isoenzymexpression. Dafür wurden sowohl *antisense* (AS)-Zelllinien von CP1- und CP2 (TANNENBERG, 2000) als auch RNAi-basierte Strategien verwendet.

#### D.1.1 Charakterisierung der Calpain-AS-Zelllinien

Zur ausführlichen Charakterisierung der *down*-Regulierung von  $\mu$ CP und mCP standen zunächst bereits im Labor generierte stabile HeLa CP1- und CP2-AS-Zelllinien zur Verfügung. In den jeweils acht etablierten stabilen AS-Zelllinien ließ sich mittels kompetitiver PCR eine spezifische semiquantitative Verringerung der CP1 mRNA-Expression auf ca. 35 – 60 % bzw. der CP2 mRNA-Expression auf ca. 51 – 93 % nachweisen. Auffallend war die Morphologie der generierten AS-Zelllinien: CP1-supprimierte Zellen waren kleiner als die *mock*-transfizierte Kontrolle und zeigten ein abgerundetes Erscheinungsbild, während die Verringerung von CP2 in langgestreckten, an Zellfortsätzen reichen Zellen resultierte. In Wachstumsstudien trat ausschließlich bei CP1-reduzierten Zellen eine langsamere Proliferation im Vergleich zur Kontrolle und CP2-reduzierten Zellen zutage. Zusammengefasst wiesen die vorliegenden Ergebnisse auf CP1 als Regulator der Zellproliferation und CP2 als Modulator der Zytoskelettorganisation hin (TANNENBERG, 2000).

Ausgehend von dieser initialen Charakterisierung wurde nun die AS-Zelllinie mit der effektivsten *down*-Regulation von *capn1* bzw. *capn2* ausgewählt und eingehend hinsichtlich der Expression von Faktoren des Calpain-Systems, der Zellmorphologie sowie diverser Zellfunktionen untersucht.

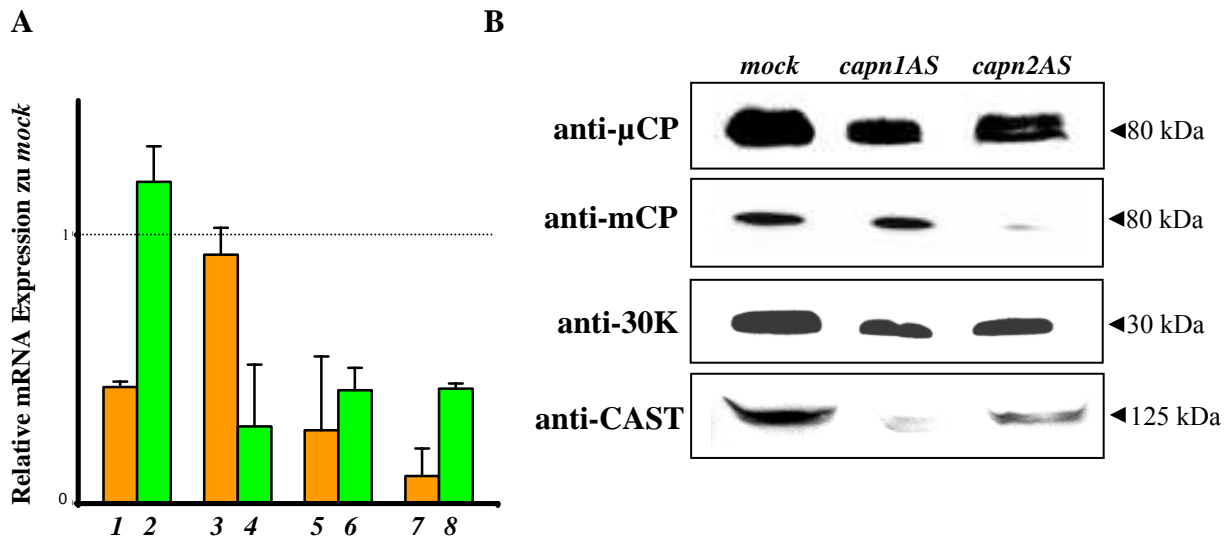
##### D.1.1.1 Spezifische Reduktion der Calpain-Expression bei *capn1AS* und *capn2AS*

Die jeweils selektierte *capn1AS*- bzw. *capn2AS*-Zelllinie wurde zunächst bezüglich ihrer CP1, CP2, CP4 und CAST mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR bzw. durch proteinanalytische Methoden wie Western Blot-Analysen, Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Aktivitätsassays charakterisiert.

Die quantitative RT-PCR (Abbildung D.1, A) von *capn1AS* zeigte eine spezifische, signifikante Verminderung der CP1 mRNA-Expression auf 43 % und der CP2 mRNA-Expression von *capn2AS* auf 29 % im Vergleich zur *mock*-Kontrolle. Interessanterweise konnte bei der Analyse der mRNA-Expressionslevel von CP4 (30K-Untereinheit) und CAST (Calpastatin) ebenfalls eine Verringerung bei *capn1AS* und *capn2AS* im Vergleich zur *mock*-Kontrolle gemessen werden, und zwar auf 27 % (*capn1AS*) und 42 % (*capn2AS*) bei CP4 bzw. auf 10 % (*capn1AS*) und 43 % (*capn2AS*) bei CAST. In Korrelation zur verminderten mRNA-Expression ließ sich auch mittels Western Blot (Abbildung D.1, B) und konfokaler *Laser-scanning*-Mikroskopie (Abbildung D.2) eine deutliche isoformspezifische Reduktion dieser Proteine detektieren. Zudem war auch eine verringerte anti-30K sowie anti-CAST Immunreaktivität im Zelllysat der Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* nachzuweisen, wobei die Vermin-

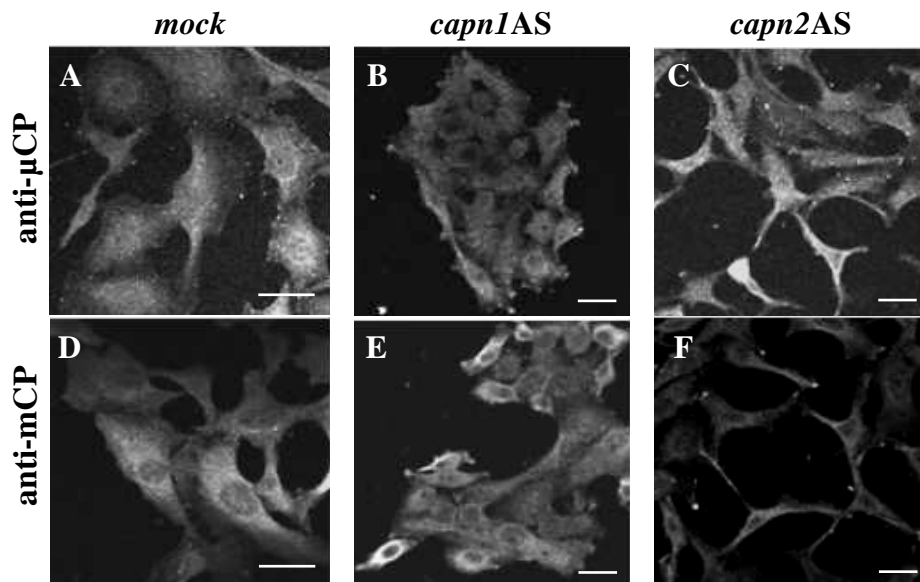


derung der 30K-Untereinheit und des CAST in der *capn1AS*-Zelllinie jeweils stärker ausgeprägt war als in der *capn2AS*-Zelllinie.



**Abbildung D.1** Spezifische Verminderung der Calpain mRNA- und Protein-Expression in AS-Zelllysaten.

- A** Durch quantitative RT-PCR mit spezifischen Primer gegen CP1 (1, 2), CP2 (3, 4), CP4 (5, 6) und CAST (7, 8) zeigte sich die spezifische Verminderung von *capn1* und *capn2* bei *capn1AS* (orange) und *capn2AS* (grün). Darüber hinaus wurde ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Expression der 30K-Untereinheit und des CAST detektiert.
- B** Die Western Blot-Analysen mit den Antikörpern anti-μCP, anti-mCP, anti-30K und anti-CAST verdeutlichen die spezifisch reduzierte Proteinexpressionen bei beiden Isoformen.



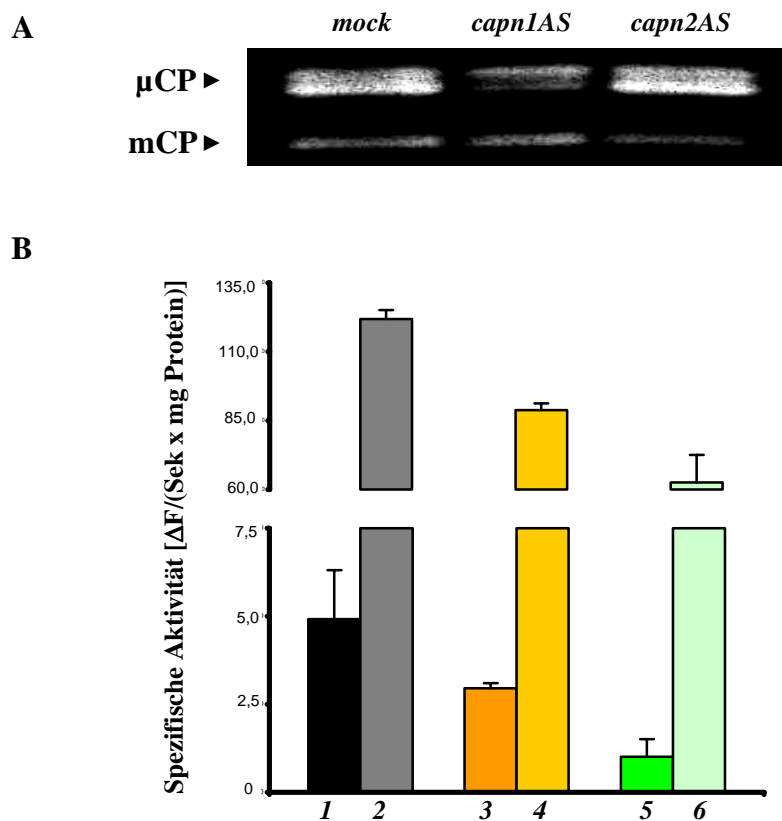
**Abbildung D.2** Spezifische Verminderung der Calpain-Expression in den AS-Zellen.

Die *mock*- (A, D), *capn1AS*- (B, E) und *capn2AS*-Zellen (C, F) wurden für die Analyse mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen μCP (A, B, C) und mCP (D, E, F) sowie mit den jeweiligen Zweitantikörper-Konjugaten goat anti-mouse Alexa633-linked und chicken anti-rabbit Alexa633-linked gefärbt. Im Unterschied zur *mock*-Kontrolle zeigten die beiden AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* eine verminderte Immunreaktivität mit den entsprechenden Antikörpern. Der Balken entspricht 10 μm.

Neben der Charakterisierung der Veränderungen im Proteingehalt der Calpainisoformen wurde auch die jeweilige Calpain-Aktivität sowohl in Gesamtzelllysaten mittels Caseinolyse als auch in intakten Zellen ohne und mit Ionomycin-Stimulation anhand der Spaltung eines fluorogenen Peptidsubstrates bestimmt.

In der Caseinzymographie zeigte sich dabei eine deutliche Reduzierung der entsprechenden basalen  $\mu$ CP- und mCP-Aktivität (Abbildung D.3, A). Als Kontrollen wurden gereinigtes humanes  $\mu$ CP und bovines mCP aufgetragen (nicht gezeigt). Für die Bestimmung der basalen und Ionomycin-stimulierten (GIL-PARRADO *et al.*, 2003, SCHOENWAEELDER *et al.*, 1997) Calpain-Aktivität in lebenden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurde das zellgängige, fluorogene Peptid-Substrat Suc-LLVY-NHMec verwendet (Abbildung D.3, B).

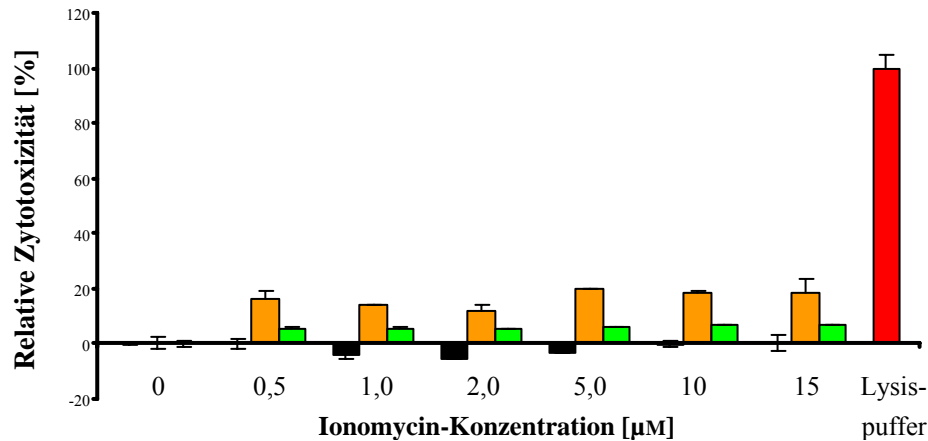
Im Vergleich zur *mock*-Kontrolle wurden in *capn1AS*-Zellen 53 % der basalen und 68 % der Ionomycin-stimulierten spezifischen Aktivität gemessen. Dagegen war bei *capn2AS*-Zellen die Calpain-Restaktivität durch das stabil inserierte AS-Konstrukt auf 22 % der basalen und auf 52 % bei der Ionomycin-Stimulation vermindert.



**Abbildung D.3 Verringerung der basalen und Ionomycin-stimulierten Calpain-Aktivität in Zelllysaten und lebenden Zellen.**

- A** Die basale Caseinolyse von *capn1AS*- und *capn2AS*-Lysaten zeigte jeweils eine Verminderung der  $\mu$ CP- bzw. mCP-Aktivität im Vergleich zu *mock*-Lysaten.
- B** Die spezifische basale (1, 3, 5) und Ionomycin-stimulierte (2, 4, 6) Calpain-Aktivität in lebenden Zellen ist bei *capn1AS* (3, 4; orange/hellorange) und *capn2AS* (5, 6; grün/hellgrün) im Vergleich zur Kontrolle (1, 2; schwarz/grau) reduziert. Die spezifische Aktivität wurde, wie in Kapitel C.2.3.11 beschrieben, bestimmt.

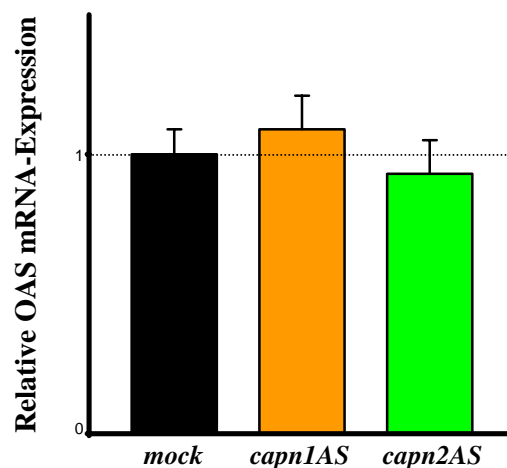
Während der Messphase waren die Zellen in einem lebenden, adhärenen Zustand und die Konzentrationen von Ionomycin bis 15  $\mu\text{M}$  zeigten in diesem Zeitraum keine nennenswerte Zytotoxizität (Abbildung D.4).



**Abbildung D.4 Ionomycin-induzierte Zytotoxizität.**

Für die Bestimmung der Ionomycin-Zytotoxizität wurden mock- (schwarz), capn1AS- (orange) und capn2AS-Zellen (grün) mit verschiedenen Ionomycin-Konzentrationen für eine Stunde inkubiert und anschließend mit PI gefärbt. Die relative Zytotoxizität wurde, wie in Kapitel C.2.3.10.3 beschrieben, bestimmt.

Um sicher zu stellen, dass den Veränderungen der Proteinexpression keine generelle Degradation aller mRNA-Transkripte zugrunde lag bzw. keine Interferonantwort durch die stabile Integration der AS-Konstrukte induziert wurde, erfolgte die Bestimmung von 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS)-mRNA (Abbildung D.5). Dabei konnte in keiner AS-Zelllinie eine Erhöhung der mRNA-Expression von OAS im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

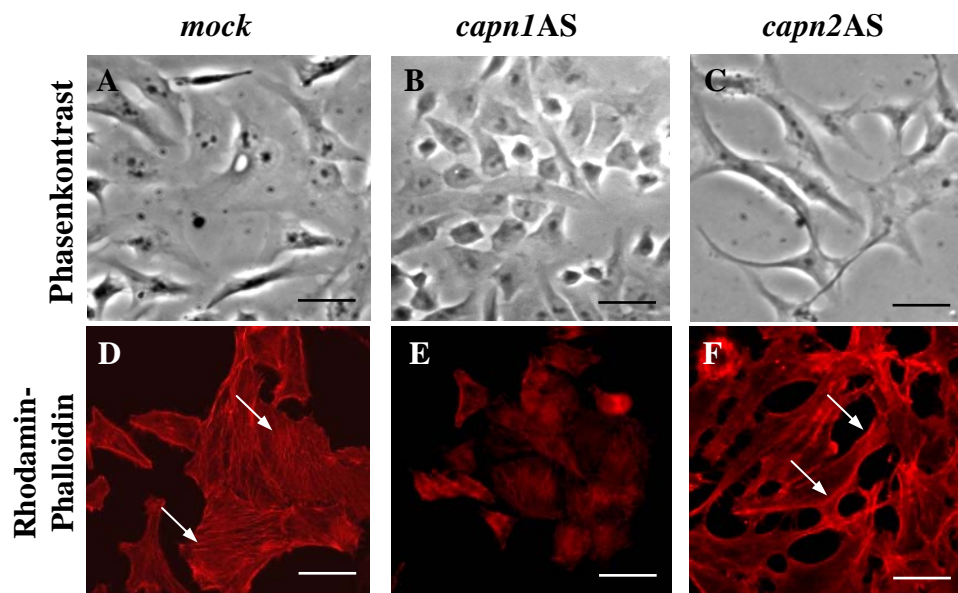


**Abbildung D.5 mRNA-Expression der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) in AS-Zellen.**

Die stabile Integration der AS-Konstrukte induzierte keine Erhöhung der OAS mRNA-Expression.

### D.1.1.2 Morphologische Unterschiede bei *capn1AS* und *capn2AS*

Bei Phasenkontrast-mikroskopischen Analysen konnte die bemerkenswerte unterschiedliche Morphologie der AS-Zellen im Vergleich zu der *mock*-Kontrolle, die stabil mit dem Leervektor transfiziert wurde, erneut bestätigt werden. In unserem Versuchsansatz wuchsen CP1-supprimierte Zellen als Kopfsteinpflaster-artige Anhäufungen mit verringerter Zellgröße, während *capn2AS*-Zellen eine langgestreckte, spindelförmige Morphologie mit mehreren Filopodien-artigen Strukturen aufwiesen. Das filamentöse F-Aktin-Netzwerk der Zellen, die mit Rhodamin-markierten Phalloidin gefärbt wurden, zeigte darüber hinaus eine Störung bei der Ausbildung von F-Aktin-Stressfasern bei *capn1AS*. Im Unterschied zu *mock*- und *capn2AS*-Zellen konnte nur eine geringe Färbung mit Rhodamin-Phalloidin beobachtet werden, und die typische Morphologie von Stressfasern fehlte völlig. Ähnlich wie die *mock*-Kontrollzellen zeigte *capn2AS* dagegen ein deutlich ausgeprägtes F-Aktin-Zytoskelett, wobei sich jedoch die Faserbündel an der äußeren Zellgrenze konzentrierten und im zytosolischen Kompartiment nahezu nicht vorhanden waren (Abbildung D.6).

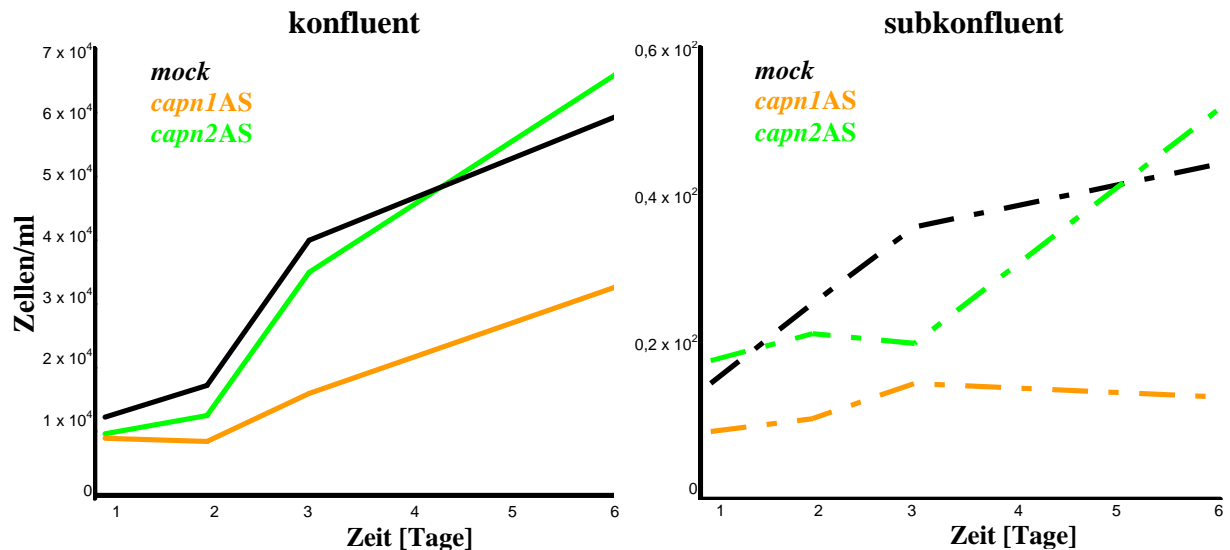


**Abbildung D.6** Unterschiedliche Morphologien der AS-Zelllinien.

Die Analyse der AS-Zelllinien mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigte im Vergleich zur *mock*-Kontrolle (A) unterschiedliche Morphologien: *capn1AS*-Zellen (B) wuchsen in Kopfsteinpflaster-artigen Anhäufungen und *capn2AS*-Zellen (C) in langgestreckter Spindelform. Die Färbung mit Rhodamin-Phalloidin dokumentierte die Anordnung des F-Aktin-Netzwerks: *mock* (D) und *capn2AS* (F) wiesen deutliche F-Aktin-Stressfasern auf (weiße Pfeile), wobei diese bei *capn2AS* vermehrt an den Zellgrenzen in dicken Bündeln auftraten. Im Gegensatz dazu konnte bei *capn1AS* (E) ein missgebildetes F-Aktin-Netzwerk beobachtet werden. Der Balken entspricht 10 µm.

### D.1.1.3 Unterschiedliches Proliferationsverhalten der AS-Zelllinien

Für die Analyse des Proliferationsverhaltens wurde jede Zelllinie in Zellkulturplatten jeweils in einer Dichte von  $1,0 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> bzw.  $1,0 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach 1, 2, 3 und 6 Tagen wurde die Zellzahl, wie in Kapitel C.2.3.4 beschrieben, analysiert (Abbildung D.7). Während bei *mock*- und *capn2AS*-Zellen sowohl bei der höheren (konfluent) als auch bei der geringeren (subkonfluent) Ausgangszelldichte keine Unterschiede in der Proliferation festgestellt werden konnten, zeigte sich bei *capn1AS* eine deutliche Verringerung der Proliferation bei einer anfänglichen Zelldichte von  $1,0 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und sogar ein Wachstumsstop bei subkonfluenten Bedingungen ( $1,0 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup>).



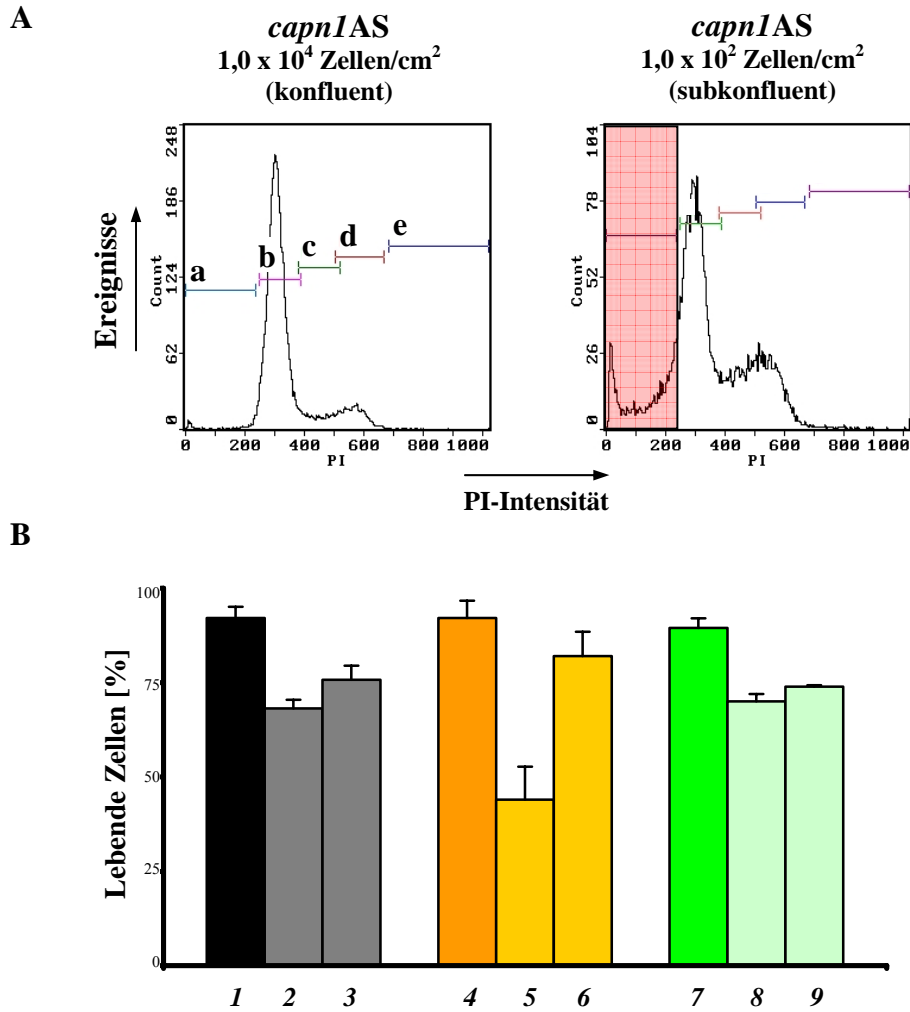
**Abbildung D.7 Zelllichte-abhängiges Proliferationsverhalten.**

In einem Proliferationsassay (Bestimmung der Zellzahl) wurden *mock*- (schwarze Linie), *capn1AS*- (orange Linie) und *capn2AS*-Zellen (grüne Linie) in den Zelldichten  $1,0 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> (konfluent, durchgezogene Linien) und  $1,0 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup> (subkonfluent, gestrichelte Linien) untersucht. Dabei konnte im Gegensatz zu *mock* und *capn2AS* eine verringerte Proliferation von *capn1AS* beobachtet werden, die im subkonfluenten Zustand (Ausgangskonzentration  $1,0 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup>) sogar stagnierte.

### D.1.1.4 Apoptoseinduktion in AS-Zelllinien bei subkonfluenter Kultivierung

Aufgrund der verringerten Proliferation von subkonfluenten *capn1AS*-Zellen wurde der Zusammenhang mit einer potentiellen Beteiligung des induzierten Zelltodes (Apoptose) untersucht (Abbildung D.8).

Vor Versuchsbeginn wurde die vergleichbare Zellvitalität der *mock*-Kontrolle und der AS-Zelllinien (Abbildung D.8, B: 1, 4, 7) bestätigt. Nach der Analyse des Proliferationsverhaltens (Abschnitt D.1.1.3) wurden die Zellen am Tag 5 mit PI gefärbt und der Anteil toter Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In Abbildung D.8, A sind exemplarisch Ergebnisse der konfluenten und subkonfluenten *capn1AS*-Zellen dargestellt, wobei die sub-G1-Population tote Zellen repräsentieren (rotes Rechteck). Interessanterweise konnte bei subkonfluenter Zelldichte ( $1 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup>) nach 5 Tagen eine deutliche Reduzierung der Vitalität von *capn1AS*-Zellen auf 47 % detektiert werden, während die Anzahl lebender Zellen von *capn1AS* (71 %) und der *mock*-Kontrolle (69 %) keine Unterschiede aufwiesen (Abbildung D.8, B). Im Versuchsansatz mit konfluenter Zelldichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) konnte keine signifikante Differenz im Anteil toter Zellen zwischen den AS-Zelllinien und der *mock*-Kontrolle beobachtet werden.



**Abbildung D.8 Induktion des Zelltods bei subkonfluenten Kultivierungsbedingungen.**

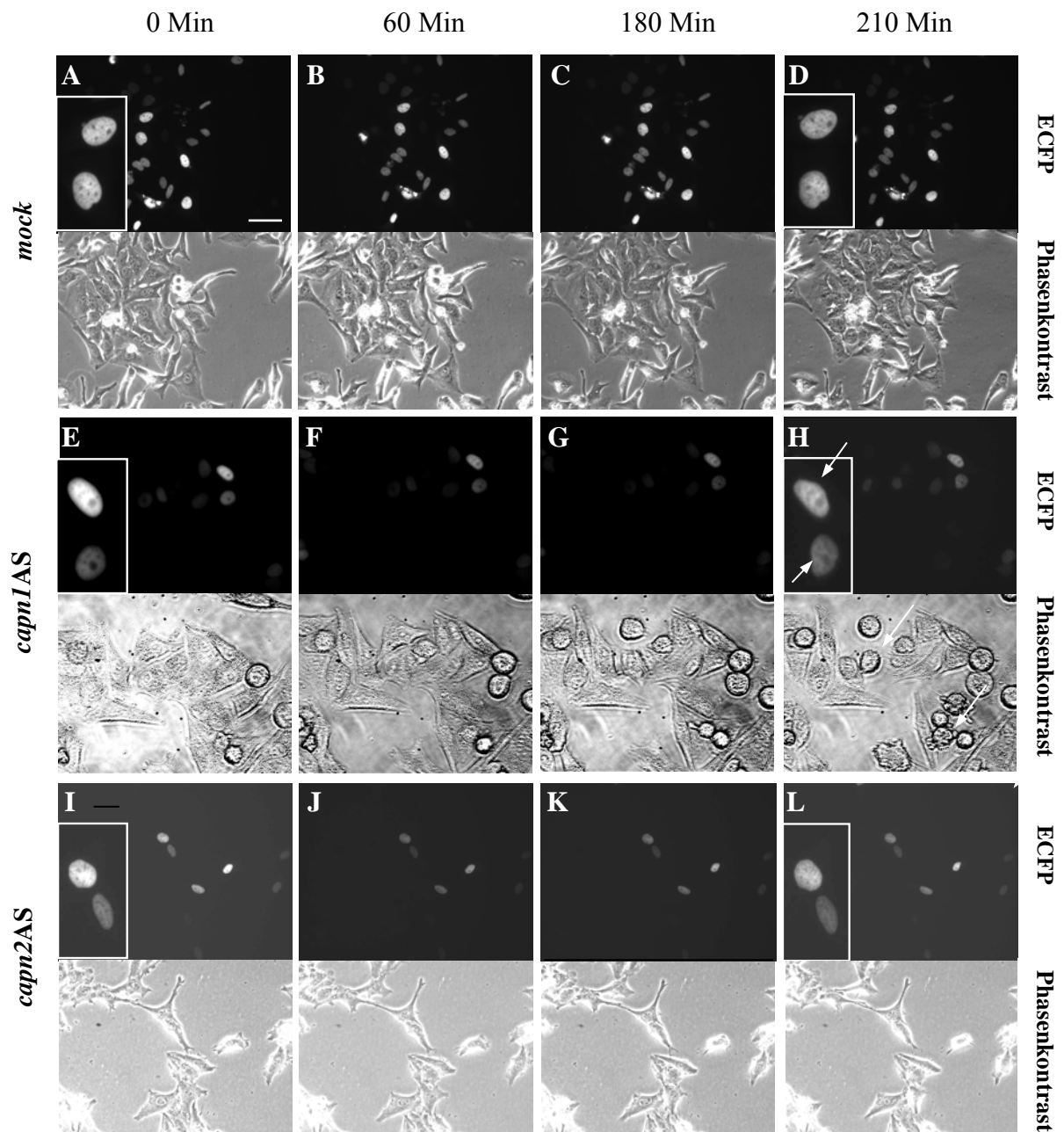
**A** Repräsentative Ergebnisse zur Bestimmung der Zellvitalität von *capn1AS*-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Färbung von 1 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (konfluent) und 1 x 10<sup>2</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (subkonfluent) mit PI. Die Population toter Zellen ist mit einem roten Rechteck gekennzeichnet.

(a:  $n < 1$ ; b:  $n = 1$ ; c:  $1 < n < 2$ ; d:  $n = 2$ ; e:  $n > 2$ ; n, Chromosomensatz; siehe Abbildung C.12)

**B** Die Zelllinien mock (1 – 3; schwarz/grau), *capn1AS* (4 – 6; orange/hellorange) und *capn2AS* (7 – 9; grün/hellgrün) wurden in den verschiedenen Zelldichten 1 x 10<sup>2</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (2, 5, 8) und 1 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (3, 6, 9) ausgesät, nach weiteren 5 Tagen mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl lebender Zellen reduzierte sich deutlich bei subkonfluenten *capn1AS*-Zellen im Vergleich zur mock-Kontrolle und *capn2AS*-Zellen nach 5 Tagen. Zur Kontrolle ist die Ausgangsvitalität der mock-Kontrolle (1) und der AS-Zelllinien *capn1AS* (4) und *capn2AS* (7) vor Versuchsbeginn aufgetragen.

Zur detaillierten Analyse der Nuklearkondensation als Apoptose-Marker wurden subkonfluente *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen auf Vitronektin-beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit pECFP-H2Ai transfiziert. Dabei ermöglicht die Expression des ECFP-Histon 2A-Fusionsproteins die mikroskopische Visualisierung der Zellkerne anhand der ECFP-Fluoreszenz. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die *mock*-Kontrolle und die AS-Zelllinien mit Ionomycin stimuliert, um die Apoptose einzuleiten (GIL-PARRADO *et al.*, 2002), und die Nuklearkondensation mikroskopisch aufgezeichnet. Dabei konnte bei *capn1AS*-Zellen nach Zugabe von 10 µM Ionomycin nach 210 Minuten eine deutliche Veränderung der Nukleus-Morphologie (Kondensation) sowie eine zunehmende Ablösung der Zellen vom Substrat detektiert werden (Abbildung D.9, H), während *mock*- und *capn2AS*-Zellen keine oder nur eine geringe Veränderung der Nukleusstruktur aufwiesen (Abbildung D.9, D und L).





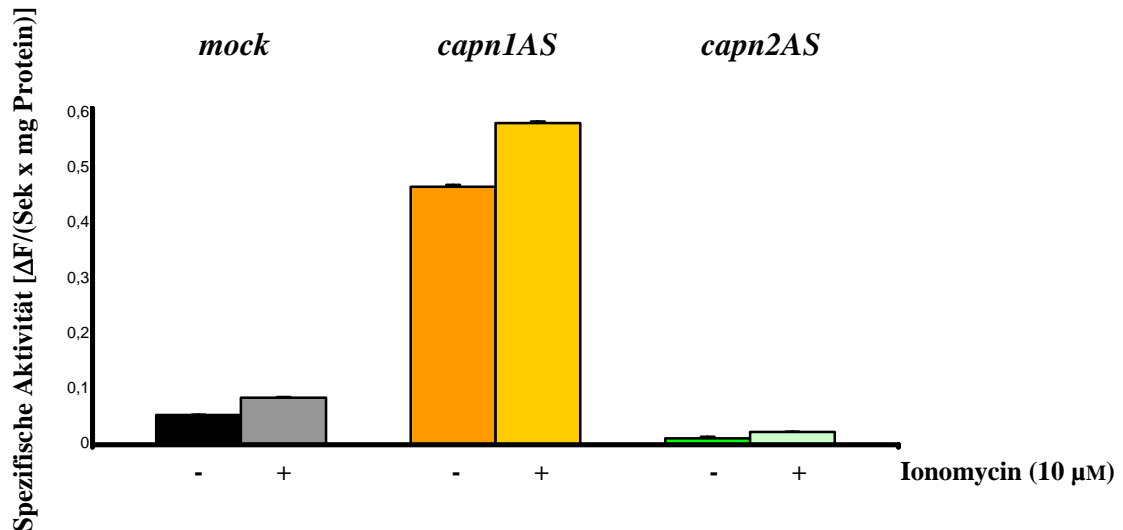
**Abbildung D.9** Analyse der Nuklearkondensation nach Ionomycin-stimulierter Apoptose.

Die Zellen *mock* (A – D), *capn1AS* (E – H) und *capn2AS* (I – L) wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Vitronectin-beschichtete Zellkulturplatten ausgesät, mit pECFP-H2Ai transfiziert und nach 48 Stunden mit 10 µM Ionomycin stimuliert. Anschließend wurden nach 0 Minuten (A, E, I), 60 Minuten (B, F, J), 180 Minuten (D, G, K) und 210 Minuten (D, H, L) Bilder mit dem ECFP-Filter sowie Phasenkontrastaufnahmen aufgenommen. Im Vergleich zu *mock*- und *capn2AS*-Zellen zeigten *capn1AS*-Zellen eine erhöhte Nuklearkondensation und Zellablösung im subkonfluenten Zustand nach Stimulierung mit Ionomycin (weiße Pfeile).

Der Balken entspricht 10 µm; exemplarisch nur in A dargestellt.

Zur Überprüfung der Beteiligung von Caspase 3/7 bei der Ionomycin-stimulierten Apoptose wurden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen auf Vitronectin-beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und subkonfluente Zellen mit dem fluorogenen Caspase 3/7-Peptid-Substrat Suc-DEVD-NHMeck inkubiert. Anschließend wurde die basale und die mit 10 µM Ionomycin-stimulierte Hydrolyse des Peptides für 210 Minuten aufgezeichnet (Abbildung D.10). Die spezifische Caspase 3/7-Aktivität wurde zudem durch die Präinkubation mit 20 µM des Caspase 3/7-Inhibitors Z-DEVD-FMK bestätigt (GIL-PARRADO *et al.*, 2002).

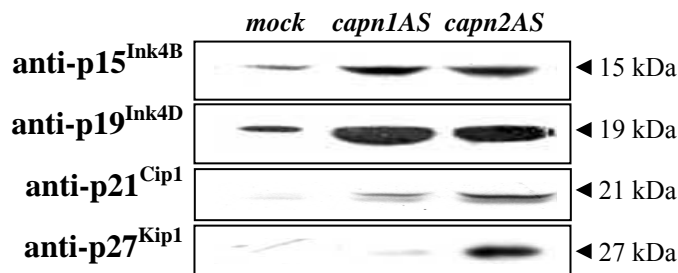
Insgesamt wurde eine ungefähr 10fach höhere spezifische Caspase 3/7-Aktivität bei basalen und Ionomycin-stimulierten subkonfluenten *capn1AS*-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle und eine etwa 25fach höhere spezifische Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu *capn2AS*-Zellen detektiert.



**Abbildung D.10 Basale und Ionomycin-stimulierte Caspase 3/7-Aktivität in lebenden AS- und Kontrollzellen.** Die Zellen *mock* (schwarz/grau), *capn1AS* (orange/hellorange) und *capn2AS* (grün/hellgrün) wurden auf Vitronectin-beschichtete Zellkulturplatten subkonfluent ( $1 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und mit einem fluorogenen Caspase 3/7-Substrat inkubiert. Anschließend wurde die basale und die mit 10 μM Ionomycin stimulierte Hydrolyse des fluorogenen Caspase 3/7-Peptid-Substrates für 210 Minuten aufgezeichnet. Die basale und Ionomycin-stimulierte Spaltung des fluorogenen Substrates Suc-DEVD-NHMeC war in *capn1AS* signifikant erhöht.

#### D.1.1.5 Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression bei AS-Zelllinien

Die konventionellen Calpaine wurden gelegentlich bereits als Regulatoren der Proliferation durch Beeinflussung der Zellzyklusprogression mittels proteolytischer Mechanismen identifiziert. So ist z. B. der *cyclin-dependent kinase* (CDK)-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> als potentiell Calpain-Substrat bekannt und dessen Degradierung durch Calpain wird für das Voranschreiten des Zellzyklus diskutiert (DELMAS *et al.*, 2003). Auf diese Studien aufbauend wurde nun zunächst in den *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen die Expression der CDK-Inhibitoren p15<sup>Ink4B</sup>, p19<sup>Ink4D</sup>, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> analysiert, um die Ursache für das unterschiedliche Proliferationsverhalten der Zelllinien genauer zu untersuchen (Abbildung D.11).



**Abbildung D.11 Expressionsniveau von CDK-Inhibitoren in AS-Zellen.**

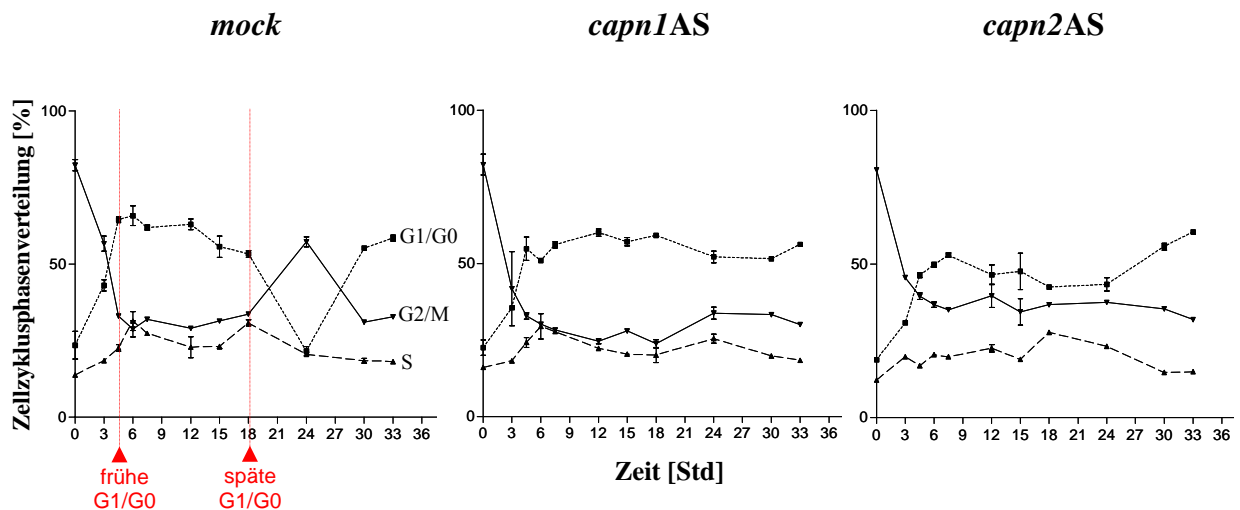
Die Zellen *mock*, *capn1AS* und *capn2AS* wurden hinsichtlich der Expression der cyclin-dependent kinase (CDK)-Inhibitoren p15<sup>Ink4B</sup>, p19<sup>Ink4D</sup>, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Expressionsniveaus dieser CDK-Inhibitoren bei *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle.



Interessanterweise wurde in den beiden Calpain-AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* eine vermehrte Expression der CDK-Inhibitoren  $p15^{\text{Ink4B}}$ ,  $p19^{\text{Ink4D}}$ ,  $p21^{\text{Cip1}}$  und  $p27^{\text{Kip1}}$  im Vergleich zur *mock*-Kontrolle gefunden. Dabei scheinen jedoch die erhöhte Expression der CDK-Inhibitoren (insbesondere von  $p21^{\text{Cip1}}$  und  $p27^{\text{Kip1}}$ ) bei *capn2AS*-Zellen und das der *mock*-Kontrolle vergleichbare Proliferationsverhalten (D.1.1.3) im Widerspruch zu stehen, während eine erhöhte Expression der CDK-Inhibitoren bei *capn1AS*-Zellen möglicherweise ursächlich für die reduzierte Proliferation in diesen Zellen sein könnte.

Zur Klärung dieser Diskrepanzen wurde daher im Folgenden die Zellzyklusprogression in den einzelnen Phasen detaillierter untersucht, um einen potentiellen Zusammenhang zwischen dem Zelldichte-abhängigen Proliferationsverhalten und der *down*-Regulation von Calpain-Isoformen besser verstehen zu können.

Die Analyse der einzelnen Zellzyklusphasen (G1/G0, S, G2/M) subkonfluenten Zellpopulationen zeigte eine deutliche Arretierung bei *capn1AS*-Zellen und eine Verlangsamung der Progression bei *capn2AS*-Zellen, während die *mock*-Kontrolle nach 24 Stunden den Zellzyklus durchlaufen hatte (Abbildung D.12). Da die AS-Zellen primär eine Beeinträchtigung der Progression in der G1/G0-Phase des Zellzyklus aufwiesen, wurden nun die einzelnen Zellzyklusproteine analysiert, die in der frühen und späten G1/G0-Phase beteiligt sind.



**Abbildung D.12 Zellzyklusphasen bei subkonfluenten AS-Zellen.**

Synchronisierte Zellen wurden mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Im Vergleich zur *mock*-Kontrolle zeigten *capn1AS*-Zellen eine deutliche Arretierung und *capn2AS*-Zellen eine Verlangsamung der G1/G0-Phase.

gepunktete Linie: G1/G0-Phase; durchgezogene Linie: G2/M-Phase; gestrichelte Linie: S-Phase.

rote Pfeile: frühe und späte G1/G0-Phase.

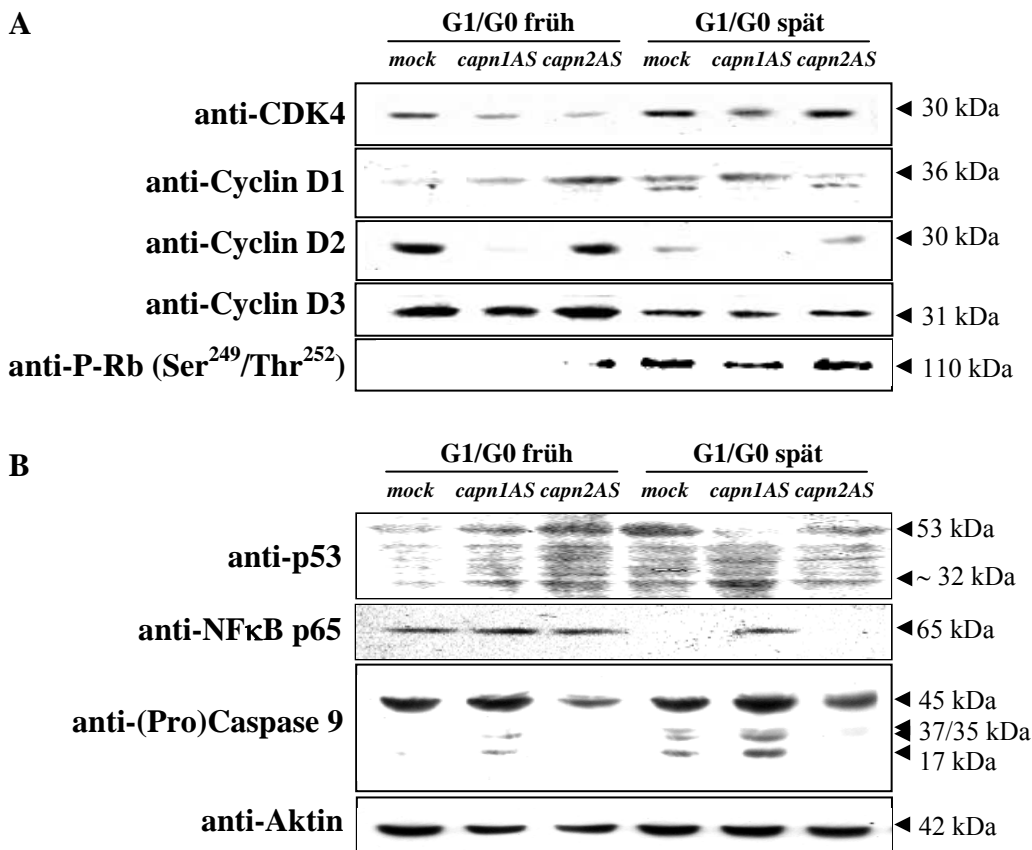
Die Zellen *mock*, *capn1AS* und *capn2AS* wurden, wie in Kapitel C.2.3.13.1 beschrieben, synchronisiert und in einer subkonfluenten Konzentration von  $1 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Vitronektin-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Für die Analyse der beteiligten Proteine der frühen G1/G0-Phase wurden die Zellen nach 4 Stunden, für die der späten G1/G0-Phase nach 18 Stunden (rote Pfeile in Abbildung D.12) mittels Western Blot-Analysen untersucht (Abbildung D.13). In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen in der frühen und späten G1/G0-Phase zunächst hinsichtlich CDK4, Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin D3 und des an Ser<sup>249</sup>/Thr<sup>252</sup> phosphorylierten Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins (P-Rb) analysiert (Abbildung D.13, A).

Dabei konnte in der frühen G1/G0-Phase neben einer ähnlichen Reduktion von CDK4 in *capn1AS* und *capn2AS* in Relation zur *mock*-Kontrolle vor allem eine niedrigere bzw. feh-

lende Expression von Cyclin D1 bzw. Cyclin D2 in *capn1AS*-Zellen im Vergleich zu *capn2AS*-Zellen festgestellt werden. In der späten G1/G0-Phase war CDK4 bei *capn1AS* gegenüber *mock* und *capn2AS* leicht vermindert. Zudem fehlte in *capn1AS* nicht nur weiterhin Cyclin D2, sondern auch ein bei *capn2AS* und *mock* auftretendes Spaltprodukt von Cyclin D1. Calpain-isoformspezifische Unterschiede in der Expression von Cyclin D3 waren bei *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen weder in der frühen noch in der späten G1/G0-Phase erkennbar.

Für die Progression des Zellzyklus ist die Phosphorylierung von Rb durch CDKs essentiell, da erst dann die Dissoziation von Transkriptionsfaktoren erfolgt und Zellzyklus-relevante Genprodukte exprimiert werden. Die Analyse dieses Faktors zeigte bei *capn1AS*-Zellen in der späten G1/G0-Phase eine leichte Verringerung von phosphoryliertem Rb an Ser<sup>249</sup>/Thr<sup>252</sup>.

Interessanterweise wiesen subkonfluente *capn1AS* in der späten G1/G0-Phase in Korrelation zur erhöhten Apoptoseneigung (Kapitel D.1.1.4) eine vermehrte Spaltung der Proform der *executioner* Caspase 9 sowie des Onkogens p53 auf (Abbildung D.13, B). Darüber hinaus war auch eine Persistenz von NFκB p65 zu belegen. Dieser Transkriptionsfaktor war im Vergleich zur frühen G1/G0-Phase bei *mock*- und *capn2AS*-Zellen nicht mehr zu detektieren.



**Abbildung D.13 Analyse von Zellzyklusproteinen im Vergleich zu NFκB p65, p53 und Pro-Caspase 9.**

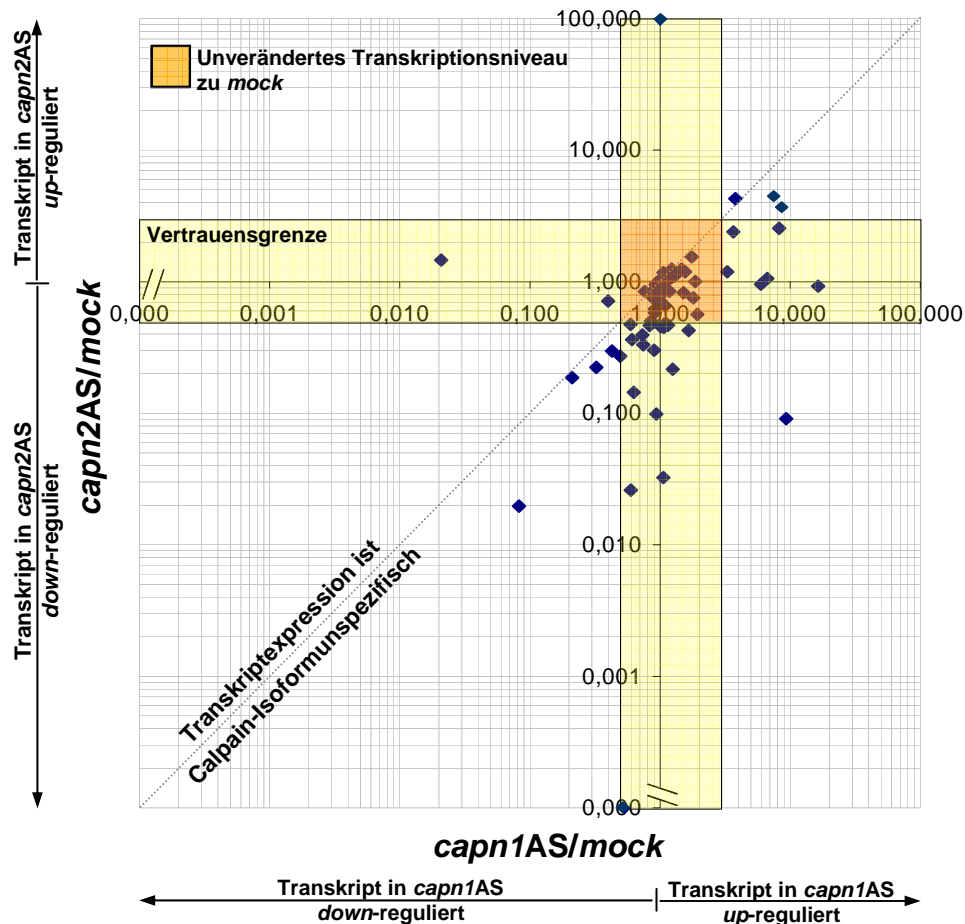
**A** Gesamtzelllysate in der frühen und späten G1/G0-Phase des Zellzyklus von *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurden elektrophoretisch getrennt und mit den Antikörpern anti-CDK4, anti-Cyclin D1, anti-Cyclin D2, anti-Cyclin D3 und anti-P-Rb (Ser<sup>249</sup>/Thr<sup>252</sup>) inkubiert.

**B** Für die Analyse Apoptose-relevanter Proteinprodukte wurden die Membranen zudem mit anti-p53, anti-NFκB p65 und anti-(Pro)Caspase 9 inkubiert. Zur Kontrolle des aufgetragenen Proteingehalts wurde die Expression von Aktin überprüft.

Ausführliche Erklärung siehe Text.

### D.1.1.6 Unterschiedliche cDNA-Profile von Signaltransduktionsfaktoren und assoziierten Genprodukten in AS- und Kontrollzellen

Um eine möglicherweise unterschiedliche Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren und assoziierten Genprodukten in Korrelation zur Calpain-Isoformexpression zumindest auf dem Transkriptionsniveau zu detektieren, wurden die AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* sowie die *mock*-Kontrollzellen mittels eines cDNA-Arrays, wie in Kapitel C.1.2.7 beschrieben, bezüglich 96 verschiedener Faktoren analysiert.



**Abbildung D.14** Auswertung der cDNA-Arrays von *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen in Bezug zur *mock*-Kontrolle.

Die Quotienten *capn1AS/mock* und *capn2AS/mock* aus der densitometrischen Analyse der cDNA-Arrays geben die Unterschiede der mRNA-Expressionsniveaus in den Calpain-AS-Zellen in Bezug zur *mock*-Kontrolle wieder.

Rotes Rechteck: kein signifikanter Unterschied zur *mock*-Kontrolle; gelbe Rechtecke: die densitometrischen Quotienten der AS-Zellen zur *mock*-Kontrolle liegen innerhalb der Vertrauensgrenze (weniger als die Hälfte und mehr als der doppelte Wert des Quotienten); gepunktete Linie: die Transkriptexpression ist Calpain-Isoformunspezifisch reguliert.

Ausführliche Erklärung siehe Text.

Für die Auswertung der Daten wurden die Intensitäten der einzelnen *Spots* bestimmt und nach Abzug des Hintergrunds auf die Kontrollen GAPDH,  $\beta$ -Aktin, Cyclophilin A und ribosomales Protein L13a normiert. Für die Darstellung der unterschiedlichen cDNA-Profile der beiden AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* in Bezug zur *mock*-Kontrolle wurden die Quotienten der densitometrischen Auswertung *capn1AS/mock* und *capn2AS/mock* bestimmt und logarithmisch aufgetragen (Abbildung D.14). Als signifikante Unterschiede wurden Signale

mit mehr als dem doppelten ( $> 2$ ; Expressionserhöhung) bzw. weniger als dem halben ( $< 0,5$ ; Expressionserniedrigung) Verhältnis zur *mock*-Kontrolle berücksichtigt. Werte innerhalb dieser Grenzen (rotes Rechteck, Abbildung D.14) sind per Definition nicht verschieden zur *mock*-Kontrolle. Gene, die auf der gepunkteten Diagonale liegen, zeigen in den AS-Zellen *capn1AS* und *capn2AS* ein gleiches Expressionsniveau.

Die in Relation zur *mock*-Kontrolle unterschiedlich regulierten Genprodukte und deren Verhältnisse zur *mock*-Kontrolle sind in Tabelle D.1 zusammengefasst. Auffälligerweise zeigten die meisten signifikant veränderten Faktoren der AS-Zelllinien, insbesondere der *capn2AS*-Zellen, eine Expressionsverminderung, während nur wenige Parameter deutlich erhöht exprimiert waren im Vergleich zur *mock*-Kontrolle.

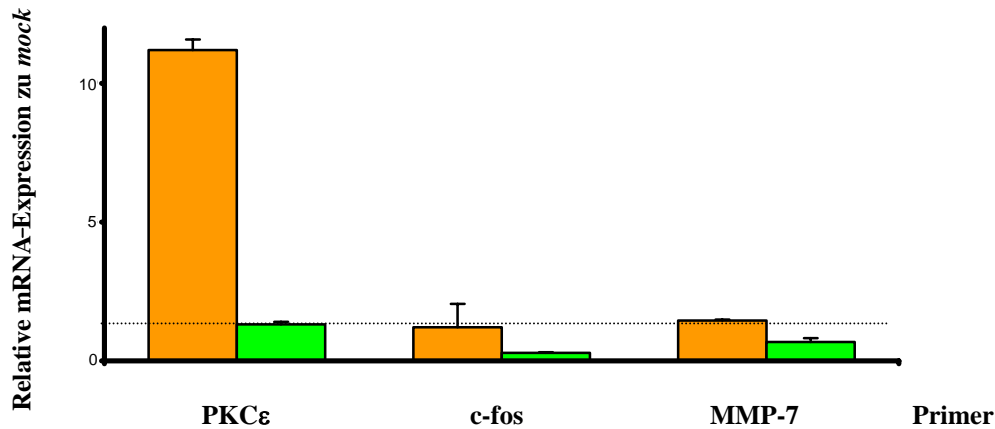
**Tabelle D.1** Spezifisch regulierte Genprodukte in *capn1AS* und/oder *capn2AS*.

Genprodukt	Spezifität*	Verhältnis AS/mock
$\alpha 2$ -Makroglobulin	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	0,427 / 0,297
Bfl-1	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	0,083 / 0,020
EN1	<i>capn2AS</i>	0,474
c-fos	<i>capn2AS</i>	0,450
HIP	<i>capn2AS</i>	0,393
Hoxa-1	<i>capn2AS</i>	0,362
Hoxb-1	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	0,496 / 0,272
ICAM-1	<i>capn2AS</i>	0,332
IGFBP-3	<i>capn2AS</i>	0,301
IL-2	<i>capn2AS</i>	n. d.
IL-2 Rezeptor	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	0,324 / 0,223
IRF-1	<i>capn2AS</i>	0,026
JunB	<i>capn2AS</i>	0,465
PSA	<i>capn2AS</i>	0,455
Leptin	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	0,211 / 0,186
TNF- $\beta$ /Lta	<i>capn1AS</i>	0,021
MIG	<i>capn2AS</i>	0,466
MMP-7	<i>capn2AS</i>	0,144
iNOS	<i>capn1AS</i>	0,399
PGR	<i>capn2AS</i>	0,099
PKC $\epsilon$	<i>capn1AS</i>	3,276
Patched 1	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	3,788 / 4,271
CRBPI	<i>capn2AS</i>	0,426
ELAM/E-Selektin	<i>capn2AS</i>	0,216
PMEPA1	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	3,650 / 2,400
TNF- $\alpha$	<i>capn1AS</i>	6,683
Fas/Apo-1/CD95	<i>capn2AS</i>	0,475
FasL	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	9,305 / 0,091
p53	<i>capn2AS</i>	0,032
VCAM-1	<i>capn1AS</i>	$> 100^{**}$
WISP-1	<i>capn1AS</i> / <i>capn2AS</i>	8,239 / 2,550
WISP-2	<i>capn1AS</i>	5,959
WISP-3	<i>capn1AS</i>	16,377

\* *capn1AS*, spezifisch in *capn1AS* reguliert; *capn2AS*, spezifisch in *capn2AS* reguliert; *capn1AS* / *capn2AS*, gleichermaßen reguliert; \*\* über der Bestimmungsgrenze; n. d., nicht detektierbar (unter der Bestimmungsgrenze). Für Abkürzungen der Genprodukte siehe Abkürzungsverzeichnis.

Um die Aussagekraft der cDNA-Array-Ergebnisse exemplarisch zu bestätigen, wurde eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression auf transkriptioneller Ebene mittels quantitativer RT-PCR und Normierung auf das *house keeping*-Gen GAPDH verifiziert. Im Hinblick auf weitere Schwerpunkte der vorliegenden Promotionsarbeit (Einfluss von Calpain-Isoformen auf Signaltransduktionsfaktoren und MMP-Expression) wurde hierfür die Quantifizierung der mRNA-Expression von PKC $\epsilon$ , c-fos und MMP-7 ausgewählt (Abbildung D.15). Für die rela-

tiven mRNA-Expressionsniveaus in Bezug zur *mock*-Kontrolle ergaben sich folgende Werte: PKC $\epsilon$ :  $11,2 \pm 3,4$  % (*capn1AS*),  $1,0 \pm 7$  % (*capn2AS*); c-fos:  $1,21 \pm 7,1$  % (*capn1AS*),  $0,28 \pm 7$  % (*capn2AS*); MMP-7:  $1,45 \pm 3$  % (*capn1AS*),  $0,65 \pm 21$  % (*capn2AS*). Hierdurch konnte auf quantitativer Ebene die im cDNA-Array ermittelten Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der mRNA-Expression einzelner Gene klar bestätigt werden.



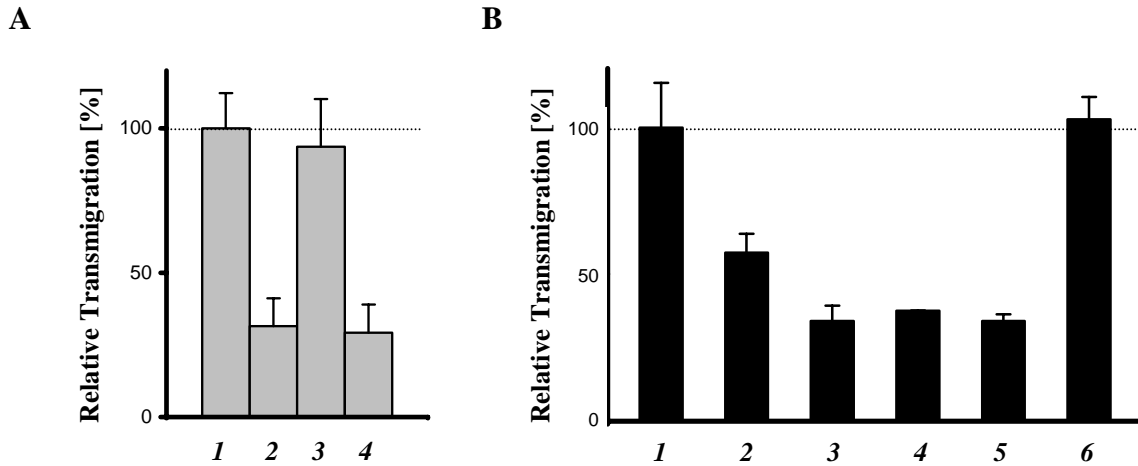
**Abbildung D.15** Bestätigung der Ergebnisse der cDNA-Arrays durch quantitative RT-PCR anhand ausgewählter Gene.

Aus den Zellen *mock*, *capn1AS* (orange) und *capn2AS* (grün) wurde mRNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Transkripte von PKC $\epsilon$ , c-fos und MMP-7 bestimmt und unter Normierung auf GAPDH bestimmt. Durch Bezug auf die Werte der *mock*-Kontrolle (gestrichelte Linie) wurde die relative mRNA-Expression von PKC $\epsilon$ , c-fos und MMP-7 berechnet.

#### D.1.1.7 Verändertes Migrationsverhalten von *capn1AS* und *capn2AS* im Vergleich zu THP-1-Zellen

Zur Klärung der Beteiligung von Calpainen bei der Transmigration von Zellen wurde in einem initialen Experiment die monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 in serumfreien Medium mit/ohne 50  $\mu$ M des spezifischen Calpain-Inhibitors CP1B für 24 Stunden präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Matrigel-beschichtete Filtermembran aufgebracht und für weitere 24 Stunden in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von 50  $\mu$ M CP1B in einer temperierten Boyden-Kammer belassen. Die transmigrierten Zellen wurden quantifiziert und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Interessanterweise zeigte nur die Langzeit-Präinkubation mit CP1B eine deutliche Reduktion der Matrigel-Transmigration auf  $29 \pm 11$  % und  $31 \pm 10$  % des jeweiligen Kontrollansatzes (Abbildung D.16, A).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden THP-1-Zellen für 6, 12, 18 und 24 Stunden vor dem Matrigel-Transmigrationsassay mit CP1B präinkubiert. Dabei erzeugte die 6stündige Hemmung mit CP1B bereits eine Verminderung der Transmigration, wobei ein Minimum nach 12 Stunden erreicht war. Längere Inkubationszeiten mit dem Inhibitor (18 und 24 Stunden) führten zu keiner weiteren Abnahme der Transmigrationsrate. Die bloße Zugabe des Inhibitors während des Transmigrationsansatzes ohne Präinkubation der Zellen mit CP1B hatte dagegen keinen Effekt auf die Zahl der durch das Matrigel als ECM-Äquivalent gewanderten Zellen (Abbildung D.16, B).

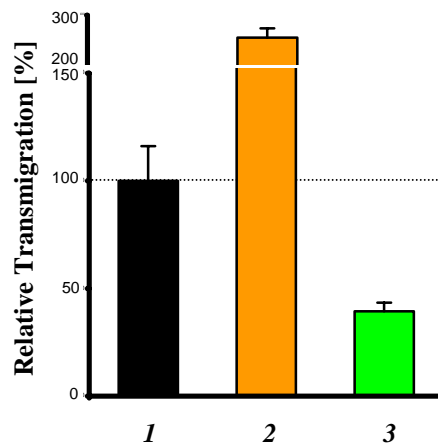


**Abbildung D.16 THP-1 Transmigration unter Langzeit-Hemmung von Calpain mit dem spezifischen Inhibitor CP1B.**

- A** Die Zellen wurden entweder mit 50  $\mu$ M CP1B (2, 4) oder ohne (1, 3) CP1B in serumfreien Medium für 24 Stunden präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum in Gegenwart (3, 4) bzw. in Abwesenheit von CP1B (1, 2) in einem Matrigel-Transmigrationsassay untersucht.
- B** Abhängigkeit der Transmigration von der Präinkubationsdauer von THP-1 mit CP1B: 1, Kontrolle ohne CP1B; Präinkubation für 6 Stunden (2), 12 Stunden (3), 18 Stunden (4) und 24 Stunden (5) mit CP1B, keine Inhibitor-Zugabe während der Transmigration; 6, CP1B nur während der Transmigration ohne Präinkubation.

Zur Aufklärung der Bedeutung der einzelnen Calpain-Isoformen bei der Zellmigration wurden nun die von HeLa-Zellen abgeleiteten AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* sowie die entsprechende *mock*-Kontrolle hinsichtlich des Migrationsverhaltens untersucht (Abbildung D.17).

Dabei zeigten nach 24 Stunden in der Boyden-Kammer *capn1AS*-Zellen eine signifikant erhöhte Transmigrationsrate ( $273 \pm 11$  %) im Vergleich zur *mock*-Kontrolle, während im gleichen Zeitraum die Zahl der transmigrierten *capn2AS*-Zellen auf  $48 \pm 4$  % reduziert war. Aus diesen Ergebnissen kann auf eine gegenläufige Einflussnahme von  $\mu$ CP und mCP auf das Transmigrationsverhalten von wandernden Zellen geschlossen werden.



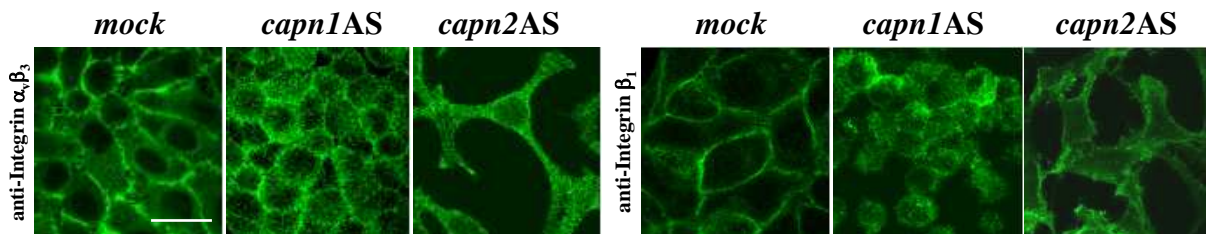
**Abbildung D.17 Transmigrationsverhalten von mock- und Calpain-AS-transfizierten HeLa-Zellen.**

Die AS-Zellen *capn1AS* (orange, 2), *capn2AS* (grün, 3) und die Kontrolle *mock* (schwarz, 1) wurden mittels eines Matrigel-Transmigrationsassays analysiert. Dabei zeigte sich eine erhöhte Transmigration von *capn1AS*-Zellen und eine verringerte von *capn2AS*-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle.

### D.1.1.8 Verändertes Integrin-Verhalten bei AS-Zellen

Um das unterschiedliche Migrationsverhalten der AS-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen näher aufklären zu können, wurde nun sowohl die Integrin-Signalübertragung als auch die Ligandenbindungsaffinität von Integrinen überprüft. Hierfür wurde die Erkenntnis genutzt, dass bei der Adhäsion von Zellen an diverse ECM-Komponenten als ersten Schritt bei der Transmigration heterodimere Integrine eine essentielle Rolle spielen, wobei für die Bindung an Vitronektin hauptsächlich das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , für Fibronektin die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , für Laminin das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  und für Kollagen IV das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  verantwortlich sind (JIN & VARNER, 2004).

In einer ersten Versuchsreihe wurde zunächst die Proteinexpression der Integrine in *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen mittels Antikörper gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bzw. gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit in der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie verifiziert (Abbildung D.18). Anhand der Färbungen konnte deutlich die Membranassoziation der Integrine bei den AS-Zellen ebenso wie bei der *mock*-Kontrolle detektiert werden.



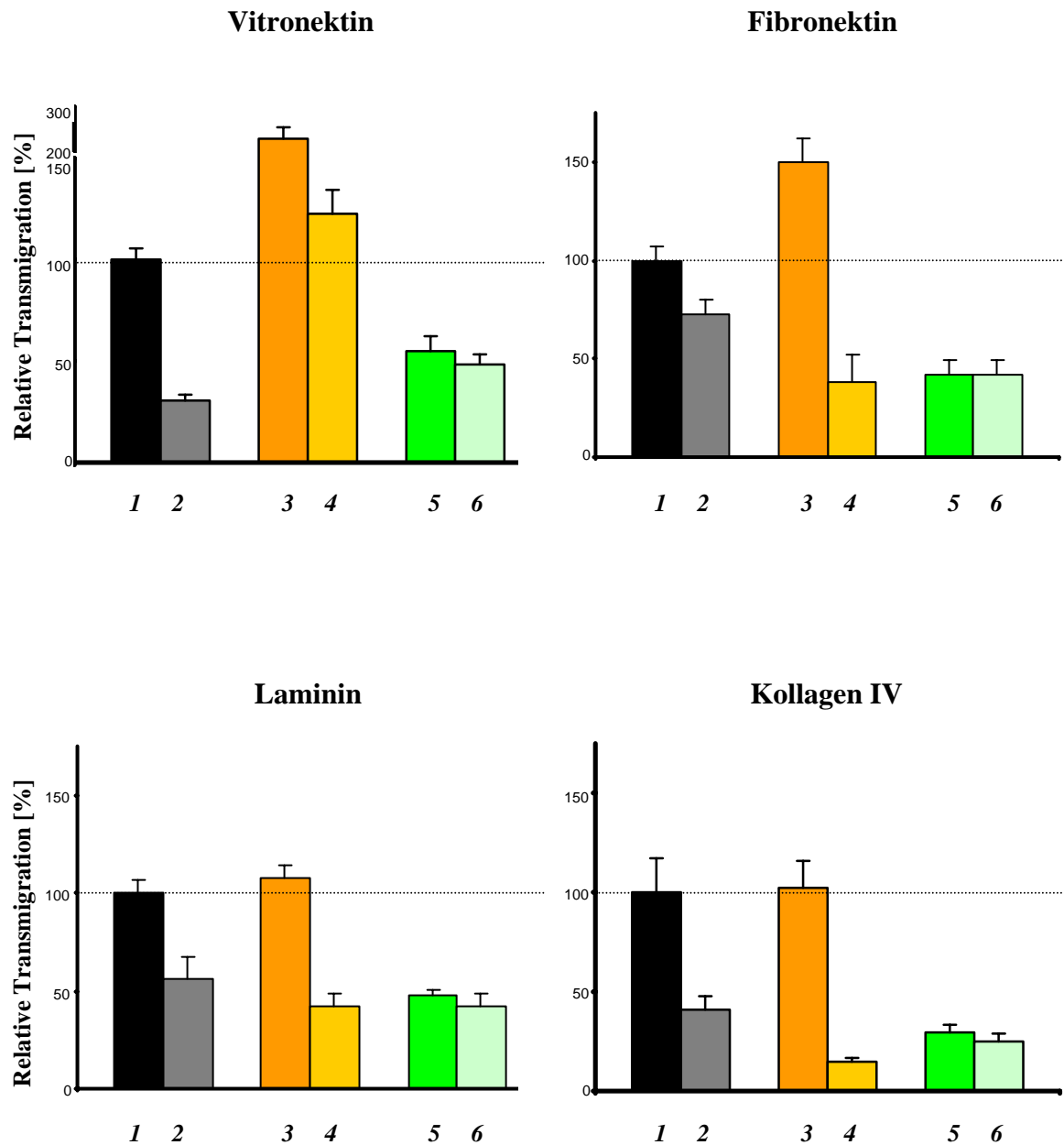
**Abbildung D.18 Expression der Integrine auf *mock*- und AS-Zellen.**

Die Integrin-Expression der Zellen *mock*, *capn1AS* und *capn2AS* wurde mittels Antikörper gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bzw. die  $\beta_1$ -Untereinheit und dem entsprechenden FITC-Konjugat in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie verifiziert.

Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Anschließend wurden die Filtermembranen für den Transmigrationsassays selektiv mit den ECM-Proteinen Vitronektin, Fibronektin, Laminin und Kollagen IV beschichtet. Vor dem Aufbringen der Zellen wurden diese geteilt und jeweils eine Fraktion mit einem Antikörper gegen die entsprechenden Integrine für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf die Filtermembranen gebracht und die transmigrierten Populationen nach 24 Stunden ausgezählt (Abbildung D.19).

Dabei zeigte *capn1AS* bei Vitronektin und Fibronektin eine erhöhte Transmigration, während diese bei Laminin und Kollagen IV der Situation bei der *mock*-Kontrolle vergleichbar war. Durch die spezifischen Integrin-Antikörper konnte bei beiden Zelllinien die Transmigration deutlich gehemmt werden. Im Gegensatz dazu brachte eine Blockierung der entsprechenden Integrine mittels der Antikörper keine Reduktion der Transmigration bei *capn2AS*, da bei diesen Zellen wohl bereits eine generelle Beeinträchtigung der Integrin-abhängigen Signalübertragung vorlag und nur eine relative Transmigrationsrate zwischen 30 und 50 % im Vergleich zur *mock*-Kontrolle ermöglichte.



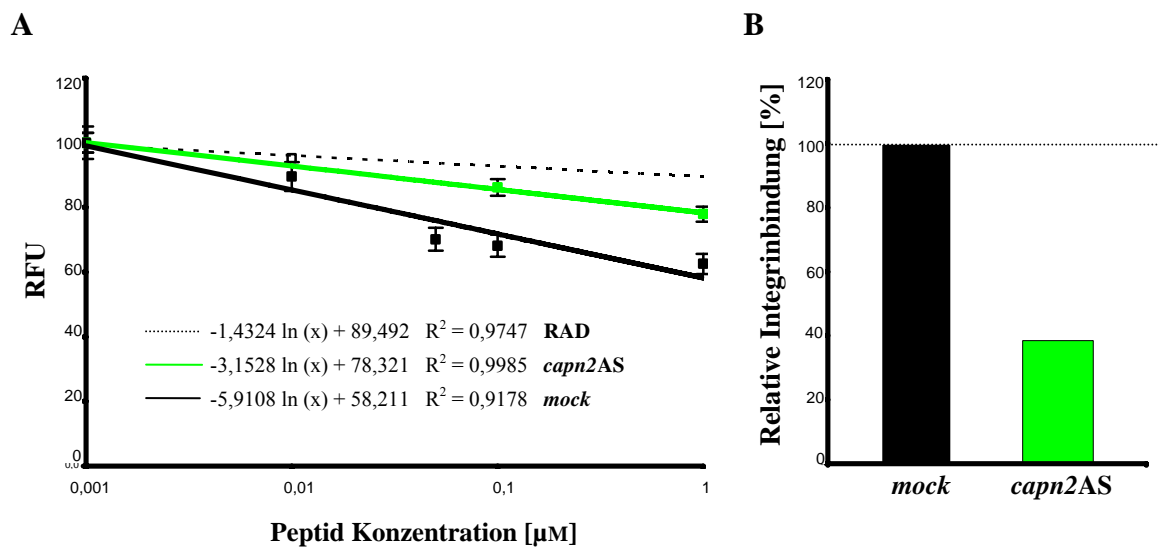
**Abbildung D.19 Integrin-Signalübertragung: Beeinträchtigung der Transmigration von AS-Zellen durch verschiedene ECM-Komponenten.**

Eine Hälfte der Zellen mock (1, 2; schwarz/grau), capn1AS (3, 4; orange/hellorange) und capn2AS (5, 6; grün/hellgrün) wurde mit entsprechenden Integrin-blockierenden Antikörpern inkubiert (2, 4, 6) und anschließend auf Vitronectin-, Fibronectin-, Laminin- oder Kollagen IV-beschichtete Filtermembranen gebracht. Im Gegensatz zu mock und capn1AS zeigte capn2AS eine generelle Beeinträchtigung der Integrin-Signalübertragung auch ohne Vorinkubation mit Integrin-blockierenden Antikörpern.



Um nun zu überprüfen, ob diese Beeinträchtigung der Signalübertragung bei *capn2AS*-Zellen möglicherweise durch eine verringerte Ligandenbindungsaktivität der Integrine zustande kommt, wurde die kompetitive Bindung eines zyklischen RGD-Peptides und eines Antikörpers gegen das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , wie in Kapitel C.2.3.9.2 beschrieben, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Verwendung eines RAD-Peptides diente zur Ermittlung einer unspezifischen Bindung.

In diesen Versuchsansätzen zeigte *capn2AS* eine beeinträchtigte Bindung von PE-markiertem Antikörper an RGD-gebundenes Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Abbildung D.20). Dabei war die relative Integrin-Bindung bei *capn2AS* im Vergleich zur *mock*-Kontrolle auf 38,4 % reduziert. Der Anteil einer unspezifischen Bindung war vernachlässigbar.



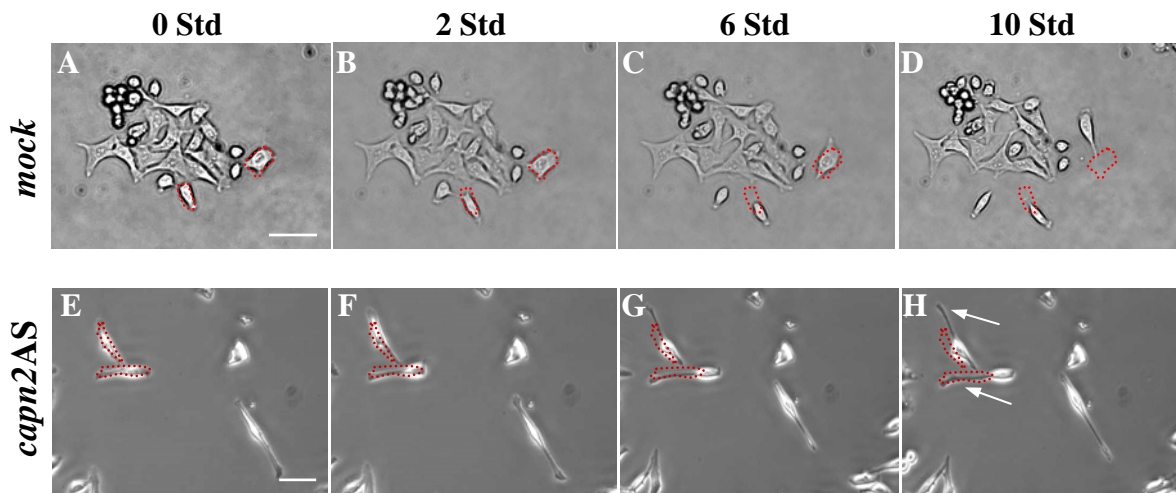
**Abbildung D.20** Verminderung der Liganden-Bindungsaffinität von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bei *capn2AS*.

- A** Bei *capn2AS* (grüne Linie) konnte im Vergleich zur *mock*-Kontrolle (schwarze Linie) eine Beeinträchtigung der Bindung des PE-markierten Antikörpers gegen RGD-Peptid beladenes Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gemessen werden. Die Bindung des Antikörpers an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zeigte eine Abhängigkeit von der zyklischen RGD-Peptidkonzentration. Die unspezifische Competition wurde mit einem RAD-Peptid bestimmt (gestrichelte Linie).
- B** Die relative Integrin-Bindung ist bei *capn2AS* reduziert. Der korrigierte Bindungswert von *capn2AS* wurde auf die *mock*-Kontrolle normiert.

### D.1.1.9 Störung der Kehrseitenablösung bei *capn2AS* und Wiederherstellung durch Überexpression eines ECFP-CP2 Vektors

Zur weiteren Untersuchung der beeinträchtigten Integrin-Signalübertragung wurden die Zellen *mock* und *capn2AS* auf Vitronektin-beschichtete Glasobjektträger ausgesät und mittels Videomikroskopie über einen Zeitraum von 10 Stunden analysiert.

Die *mock*-Kontrolle zeigte eine deutliche Bildung der Lamellipodien-Front und eine Polarisierung des Zellkörpers. Durch die Generierung neuer Zell-Substratkontakte waren auch *capn2AS*-Zellen in der Lage, die *anterior*-Seite nach vorne zu schieben. Die Kehrseite haftete jedoch am Substrat und konnte weder abgelöst, noch der Zellkörper kontrahiert werden (Abbildung D.21; Videomaterial im Anhang auf CD-ROM). Dies führte zur charakteristischen langgestreckten, spindelförmigen Morphologie von *capn2AS*.



**Abbildung D.21 Störung der Kehrseitenablösung bei *capn2AS*.**

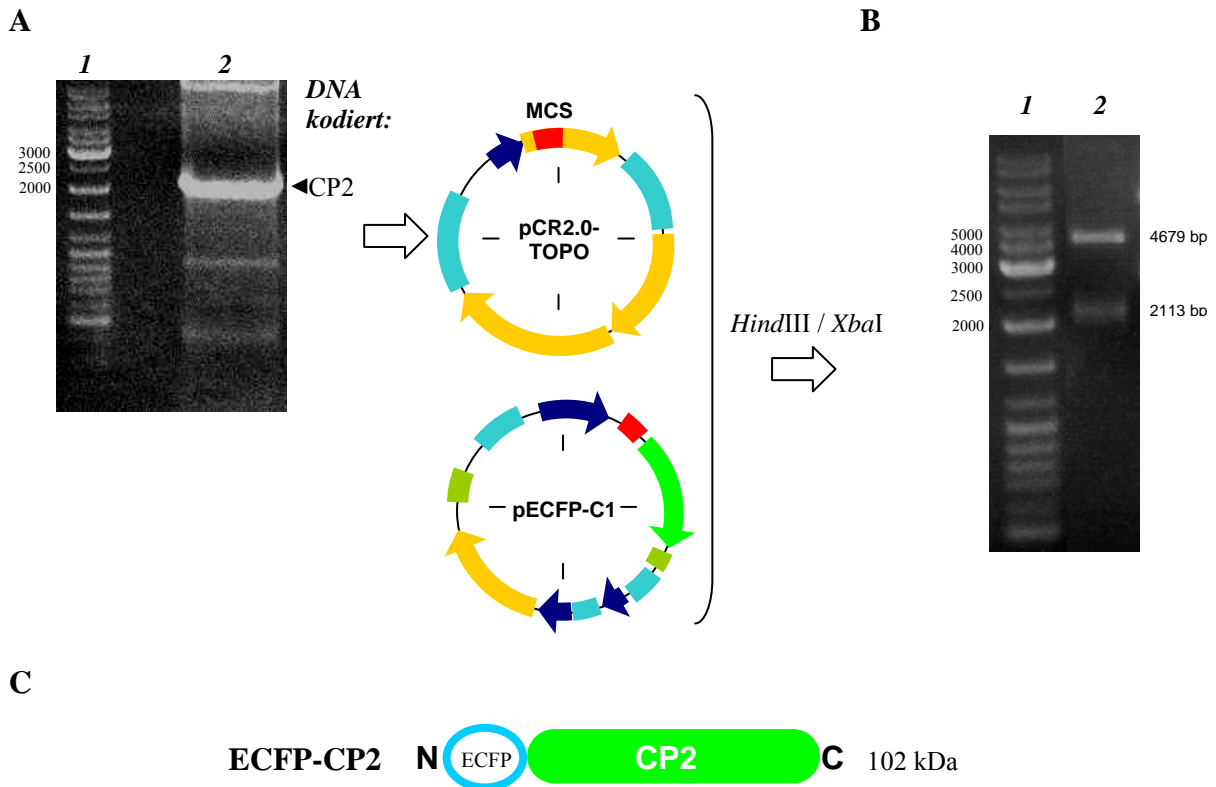
Die Zellen *mock* (A – D) und *capn2AS* (E – H) wurden auf Vitronektin-beschichtete Glasobjektträger gesetzt und über einen Zeitraum von 10 Stunden mittels Videomikroskopie analysiert. Im Gegensatz zur *mock*-Kontrolle zeigte *capn2AS* eine Störung der Kehrseitenablösung. Die Posterior-Seite ist mit dem Substrat an der Ausgangsposition (rote gestrichelte Linie) verknüpft, und der Zellkörper kann nicht kontrahiert werden, was zu einer langgestreckten, spindelförmigen Morphologie führte (H, weiße Pfeile).

Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ .

Um die *down*-Regulierung von CP2 als tatsächliche Ursache für die gestörte Kehrseitenablösung zu verifizieren, wurde nun versucht, mittels eines CP2-ECFP Vektors die Expression der großen katalytischen Untereinheit CP2 von m-Calpain in *capn2AS*-Zellen wieder zu rekonstituieren.

Hierfür wurde zunächst der CP2-ECFP Vektor rekombinant hergestellt, wobei die kodierende Sequenz von *capn2* in den Fluoreszenzexpressionsvektor pECFP-C1 kloniert wurde (Abbildung D.22). Der Klonierungs-Vektor pUC18+*capn2*, hergestellt von Dr. Koichi Suzuki, diente als Vorlage für die PCR. Die klonierte Sequenz entspricht der mRNA des humanen *capn2* (NM\_001748). Mit den Primern *EcoRI*\_capn2For und *KpnI*\_capn2Rev wurde die kodierende Sequenz für CP2 amplifiziert. Gleichzeitig wurden mittels PCR (für die weitere Klonierung in pECFP-C1) die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *KpnI* eingeführt (95 °C/10 Min; [95 °C/1 Min → 60 °C/1 Min → 72 °C/1 Min] x 30 Zyklen; 72 °C/6 Min; 4 °C/∞).

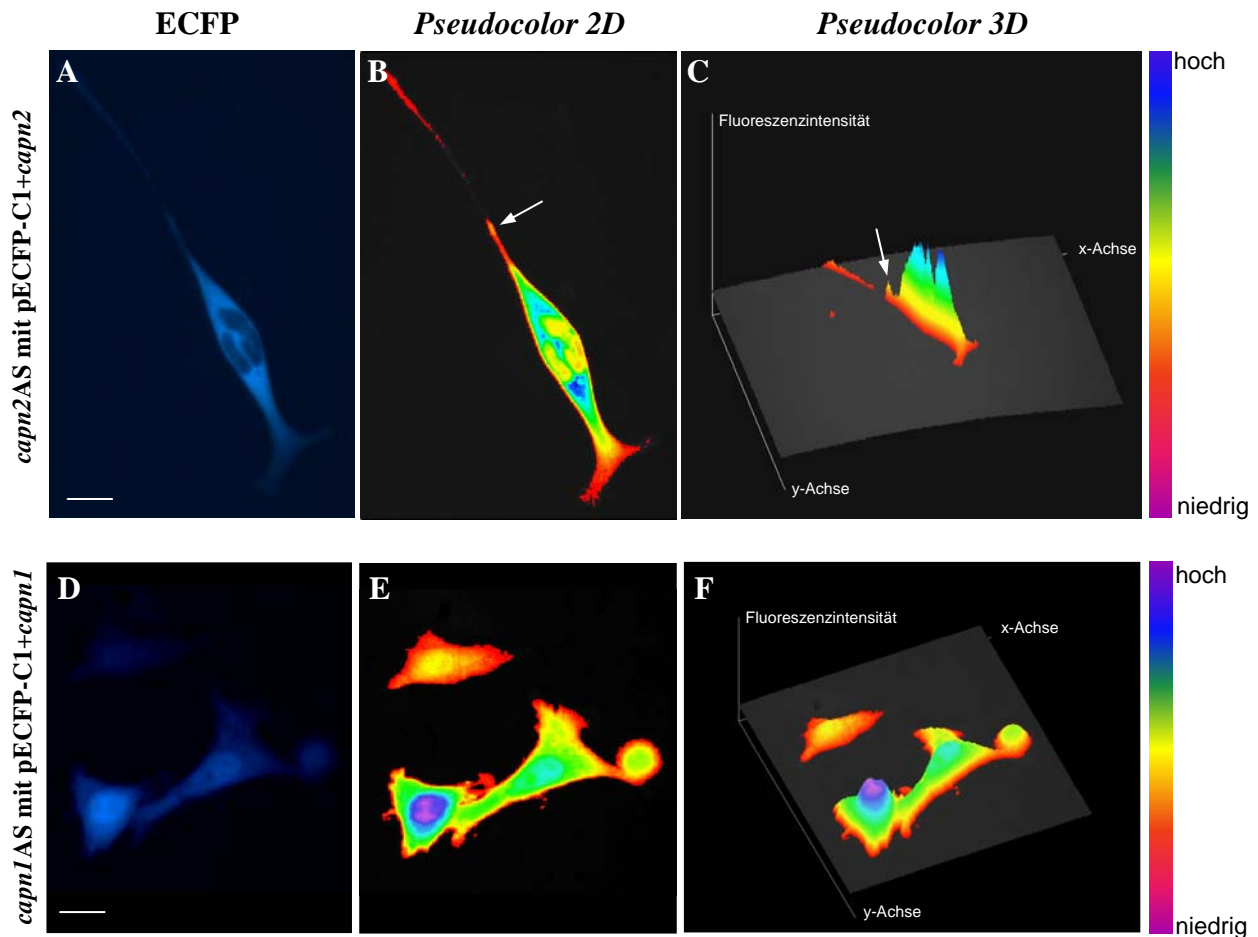
Nach Subklonierung in den pCR2.0-TOPO Vektor, wurde die Korrektheit durch DNA-Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden pCR2.0-TOPO+*capn2* und pECFP-C1 mit *Hind*III und *Xba*I verdaut und die kodierende Sequenz von CP2 in den Fluoreszenzprotein-Empfängervektor ligiert. Eine abschließende analytische Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigte den korrekten Einbau des *capn2*-Fragmentes.



**Abbildung D.22 Herstellung von pECFP-C1+*capn2*.**

- A** Die kodierende Sequenz von CP2 wurde mittels PCR amplifiziert und in den Klonierungsvektor pCR2.0-TOPO eingebracht. Anschließend wurde dieser und der Empfängervektor pECFP-C1 mit *Hind*III und *Xba*I verdaut und die entsprechenden Fragmente miteinander ligiert [1, Marker; 2, mittels PCR amplifizierte kodierende Sequenz für CP2 aus pUC18+*capn2* (2113 bp)].
- B** Die analytische Restriktion bestätigte den korrekten Einbau des CP2-Fragments [1, Marker; 2, pECFP-C1+*capn2* verdaut mit *Hind*III und *Xba*I, 4679 und 2113 bp].
- C** Schematische Darstellung von ECFP-CP2.

Nun wurde die *capn2*AS-Zelllinie auf Vitronectin beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit dem Vektor pECFP-C1+*capn2* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die höchste Fluoreszenzintensität zeigte sich an kernnahen zytoplasmatischen Bereichen. Jedoch konnte eine deutlich erhöhte ECFP-Fluoreszenz an der Kehrseite der CP2-ECFP überexprimierenden *capn2*AS-Zelle im Gegensatz zur Lamellipodien-Front detektiert werden (Abbildung D.23, B und C, weißer Pfeil). Die Konzentrierung der ECFP-Fluoreszenz deutet auf eine potentiell gehäufte CP2-Lokalisierung an diesen Strukturen hin. In Langzeitbeobachtungen zeigten CP2-ECFP überexprimierende *capn2*AS-Zellen der *mock*-Kontrolle vergleichbare Migrationseigenschaften mit wiederhergestellter Kehrseitenablösung.



**Abbildung D.23 Überexpression von ECFP-CP2 in *capn2AS* und ECFP-CP1 in *capn1AS*.**

Die AS-Zelllinie *capn2AS* wurde mit pECFP-C1+*capn2* (A, B, C) transfiziert und nach 48 Stunden mittels Epifluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Für eine deutlichere Darstellung der CP2-ECFP-Verteilung wurde die ECFP-Fluoreszenz (A) in Pseudocolor 2D (B) und 3D (C) dargestellt. An der Kehrseite der migrierenden Zelle konnte eine erhöhte ECFP-Fluoreszenz detektiert werden (weißer Pfeil).

Zudem wurde die Zelllinie *capn1AS* mit pECFP+*capn1* (D, E, F) transfiziert und nach 48 Stunden mittels Epifluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dabei konnte die Überexpression zwar die Morphologie in Richtung HeLa-typischer Zellen wieder rekonstituieren, aber es war keine erhöhte ECFP-Fluoreszenz (D), auch nicht in Pseudocolor 2D (E) und 3D (F), an membrannahen Strukturen zu erkennen.

Der Balken entspricht 5 µm.

#### D.1.1.9 Wiederherstellung der HeLa-typischen Morphologie in *capn1AS* durch Überexpression eines ECFP-CP1 Vektors

In einem weiteren Ansatz wurde *capn1AS* mit pECFP-C1+*capn1* transfiziert. Zwar konnte die Überexpression von CP1 in *capn1AS* die HeLa-typische Morphologie entsprechend der *mock*-Kontrolle rekonstituieren (siehe Bildmaterial im Anhang), jedoch war im Vergleich zu *capn2AS*, die ECFP-CP2 überexprimierten, keine erhöhte ECFP-Fluoreszenz an membrannahen Strukturen zu erkennen (Abbildung 23, D – F).

### D.1.2 Herstellung von RNAi-Systemen und Charakterisierung von Calpain-RNAi-Zellen

Da mit den verfügbaren AS-Zelllinien vorrangig nur Effekte der *down*-Regulierung der großen Untereinheiten (80K) von  $\mu$ CP und mCP untersucht werden konnten, haben wir uns entschlossen, für weitere Studien ein flexibles, universell einsetzbares System zur spezifischen Regulierung der Expression diverser Zielgene, wie etwa auch des CP4 (30K-Untereinheit von  $\mu$ CP und mCP) und potentieller isoformspezifischer Substrate, zu entwickeln. Als Methode der Wahl bot sich hierfür die RNAi-Technologie an. Im Folgenden werden nun zunächst die Herstellung und Charakterisierung verschiedener RNAi-Systeme und anschließend das Migrationsverhalten von Calpain-RNAi-Zellen detailliert beschrieben.

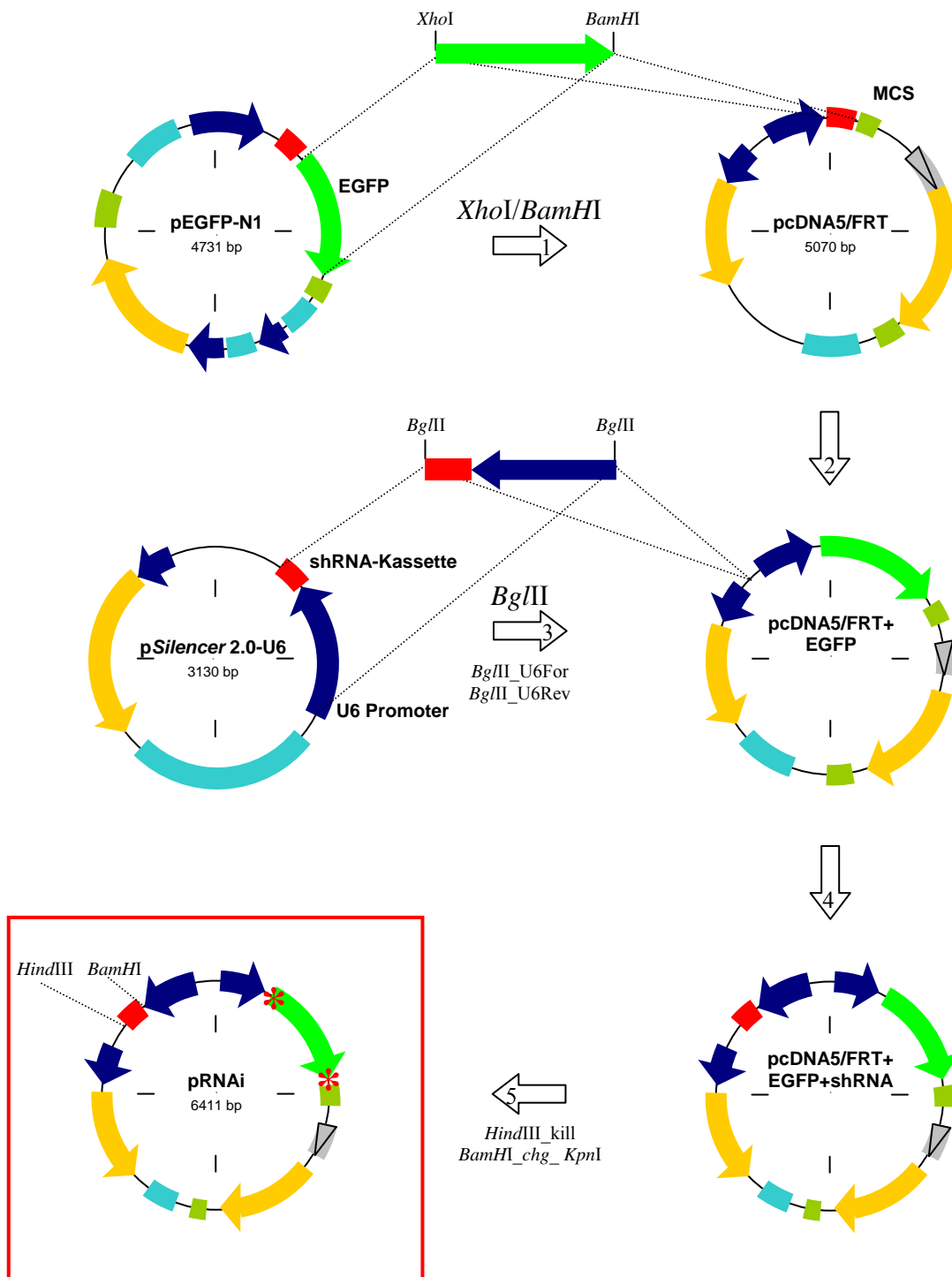
#### D.1.2.1 Herstellung des RNAi-Vektors

Die Klonierungsstrategie zur Herstellung des RNAi-Vektors (pRNAi) ist in Abbildung D.24 wiedergegeben. Aus dem Fluoreszenzprotein-Vektor pEGFP-N1 wurde die kodierende Sequenz für EGFP mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* ausgeschnitten (Abbildung D.24, *Schritt 1*) und in die MCS von pcDNA5/FTR ligiert (*Schritt 2*).

Mittels PCR wurde aus dem Vektor pSilencer 2.0-U6 mit den Primern *BglIII\_U6For* und *BglIII\_U6Rev* der U6 Promoter mit anschließender shRNA-Kassette unter folgenden Bedingungen amplifiziert (Abbildung D.24, *Schritt 3* und Abbildung D.25, A): (95 °C/6 Min; [95 °C/1 Min  $\rightarrow$  54 °C/1 Min  $\rightarrow$  69 °C/3 Min] x 30 Zyklen; 69 °C/6 Min; 4 °C/ $\infty$ ). Das PCR-Produkt wurde mit *BglIII* geschnitten und *blunt-end* in den Vektor pcDNA5/FRT+EGFP ligiert (Abbildung D.24, *Schritt 4*). Mittels analytischer Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* konnten anschließend Klone unterschieden werden, bei denen die RNAi-Kassette in *forward* (845 bp, 2322 bp, 3430 bp) oder *reverse* (845 bp, 2057 bp, 3695 bp) Orientierung in den Vektor pcDNA5/FRT+EGFP eingebaut wurde (Abbildung D.25, B) Der Vektor in *reverse* Orientierung wurde für die folgende Mutagenese verwendet.

Durch Mutagenese (siehe auch Kapitel C.2.1.3) wurden eine *HindIII* Schnittstelle zerstört (*HindIII\_kill*) und eine *BamHI* Schnittstelle durch *KpnI* ausgetauscht (*BamHI\_chg\_KpnI*), so dass shRNA-Kassetten in die nun singulären *HindIII* und *BamHI* Restriktionsstellen von pRNAi eingebracht werden konnten (Abbildung D.24, *Schritt 5*). Die erfolgreiche Mutagenese wurde anschließend durch eine analytische Restriktion mit *HindIII* und *KpnI* bestätigt (Abbildung D.25, C). Ab diesem Zeitpunkt wurde der Vektor als pRNAi bezeichnet.

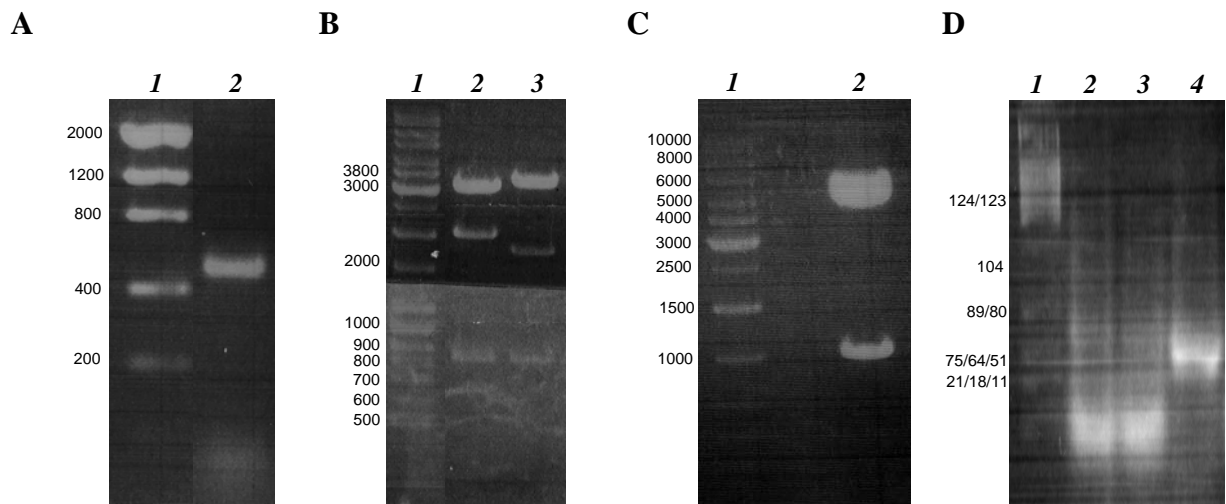
Schließlich wurden spezifische shRNA-Kassetten durch Hybridisierung hergestellt (Abbildung D.16, D) und über die Schnittstellen *HindIII* und *BamHI* in den Vektor pRNAi eingebracht.



**Abbildung D.24 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Herstellung des RNAi-Vektors pRNAi.**

Die Genabschnitte sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Durch PCR eingeführte Punktmutationen sind mit einem roten Stern gekennzeichnet.

Für eine ausführliche Erklärung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.



**Abbildung D.25 Dokumentation einzelner Schritte bei der Herstellung von pRNAi.**

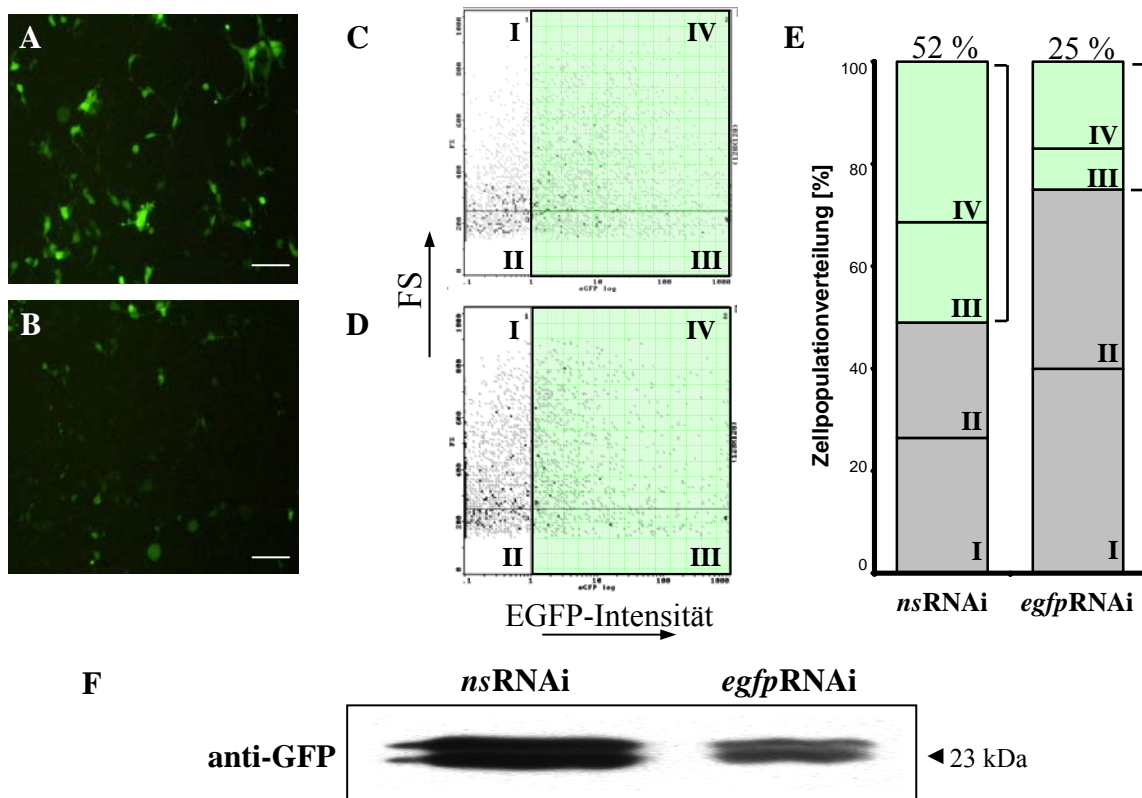
- A** Amplifikation der siRNA-Kassette (1, Marker; 2 PCR-Produkt 530 bp).
- B** Analytische Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* zur Unterscheidung der beiden möglichen Klone in forward und reverse Orientierung (1, Marker; 2, forward Orientierung 845 bp, 2322 bp, 3430 bp; 3, reverse Orientierung 845 bp, 2057 bp, 3695 bp).
- C** Analytische Restriktion mit *HindIII* und *KpnI* nach der Mutagenese von *pcDNA5/FRT+EGFP* (1, Marker; 2, Restriktionsprodukte 1547 bp und 4864 bp).
- D** Hybridisierung von shRNA-Oligonukleotiden für die anschließende Ligation in pRNAi (1, Marker V; 2, shRNA Oligonukleotid sense, 64b; 3, shRNA-Oligonukleotid antisense, 64 b; 4, shRNA-Kassette, 64 bp).

#### D.1.2.2 Etablierung von pRNAi-Systemen in Hek293- und HeLa-Zellen

Für die Etablierung und Validierung der RNAi-Induktion mittels des hergestellten Vektors pRNAi wurden Hek293-Flp-in T-Rex-Zellen mit pEGFP-C1 transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die zweite Transfektion mit den Plasmiden pRNAi<sub>ns</sub> und pRNAi<sub>egfp</sub> (Zellen, die mit pRNAi-Varianten transfiziert worden waren, wurden nach dem zu regulierenden Gen benannt, wie etwa *egfpRNAi*). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch und mittels des Durchflusszytometers ausgewertet (Abbildung D.26).

Im Gegensatz zur *nsRNAi*-Kontrolle zeigte *egfpRNAi* eine Reduktion der gemessenen EGFP-Intensität von 52 % (*nsRNAi*) auf 25 % (Abbildung D.26, B, D). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot-Analyse konnte eine deutliche Reduktion der EGFP-Expression bei *egfpRNAi* im Vergleich zu *nsRNAi* detektiert werden (Abbildung D.26, E).

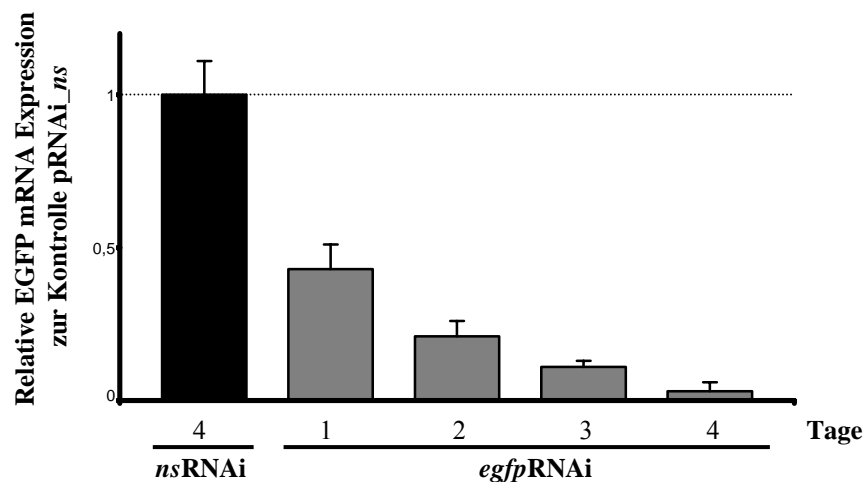




**Abbildung D.26 Etablierung von pRNAi in Hek293-Flp-in T-Rex-Zellen.**

Mit pEGFP-C1 transfizierte Hek293-Flp-in T-Rex-Zellen wurden nach 24 Stunden zusätzlich mit pRNAi\_ns (A) oder mit pRNAi\_egfp (B) transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden zeigte sich mikroskopisch eine deutlich verminderte Anzahl EGFP-positiver Zellen. Auch durchflusszytometrisch konnte eine Verringerung der EGFP-Zellpopulation bei egfpRNAi (D) im Gegensatz zur Kontrolle nsRNAi (C) festgestellt werden. Die einzelnen Zellpopulationen sind im EGFP-FS-Diagramm mit römischen Ziffern gekennzeichnet: I, große Zellen/keine EGFP-Fluoreszenz; II, kleine Zellen/keine EGFP-Fluoreszenz; III, kleine Zellen/EGFP-Fluoreszenz; IV, große Zellen/EGFP-Fluoreszenz. Die prozentuale Zellpopulationverteilung der durchflusszytometrischen Analyse ist in E dargestellt. Zudem konnte das Ergebnis mittels Western Blot-Analyse (F) bestätigt werden. Der Balken entspricht 30  $\mu$ m. Grüne Rechtecke, EGFP-positive Zellen.

Zur Bestimmung der verbleibenden EGFP mRNA nach der Transfektion von pRNAi\_egfp in zuvor mit pEGFP-C1 transfizierte Hek293-Zellen wurden diese nach 1, 2, 3 und 4 Tagen lysiert und die RNA isoliert. Dabei wurde die relative EGFP mRNA-Expression in Bezug gesetzt zu der noch am Tag 4 in der Kontrolle pRNAi\_ns vorhandenen Menge.

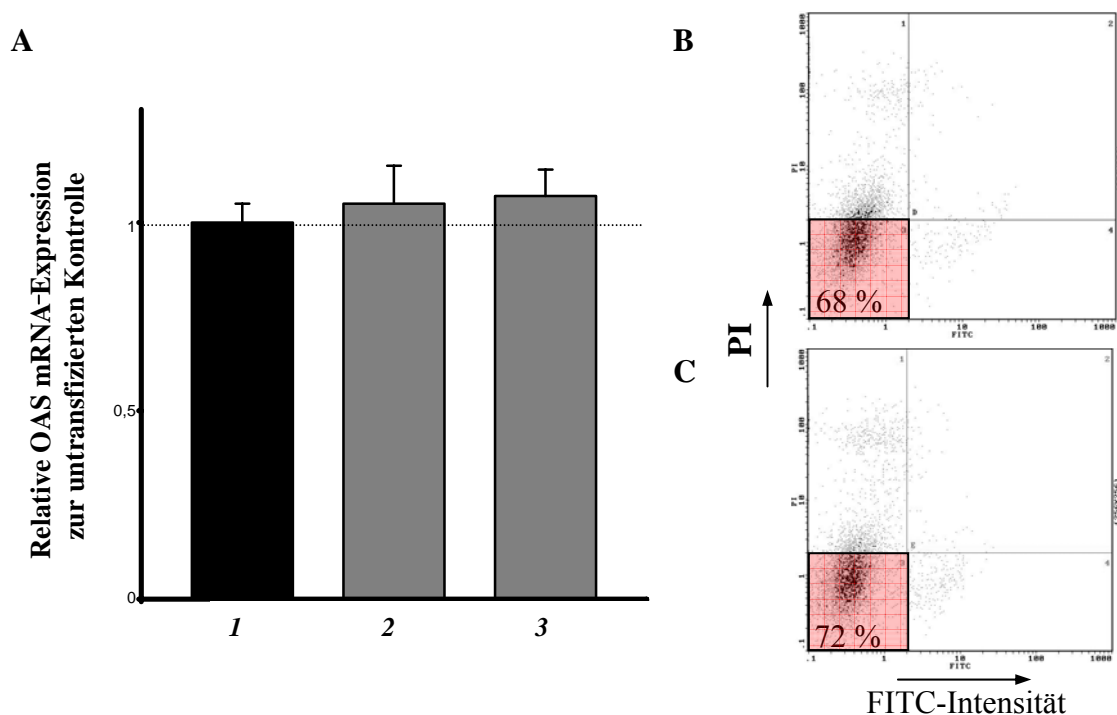


**Abbildung D.27 Zeitabhängige Verringerung der relativen EGFP mRNA-Expression durch pRNAi\_egfp in pEGFP-C1 transfizierten Hek293-Flp-in T-Rex-Zellen.**



Wie in Abbildung D.27 dargestellt konnte in den pRNAi\_egfp-Zellen bereits nach 24 Stunden eine Reduktion der EGFP mRNA auf 43 % festgestellt werden, die im Verlauf der Versuchszeit bis auf 2 % des Kontrollwertes abnahm.

Nachdem die Funktionalität des pRNAi-Systems mit den Kontrollen *ns*RNAi und *egfp*RNAi gezeigt worden war, wurden die mRNA-Expression von 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) und der Anteil apoptotischer, nekrotischer und spät-apoptotischer Zellen nach der Transfektion der Plasmide pRNAi\_*ns* und pRNAi\_*egfp* durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung D.28).

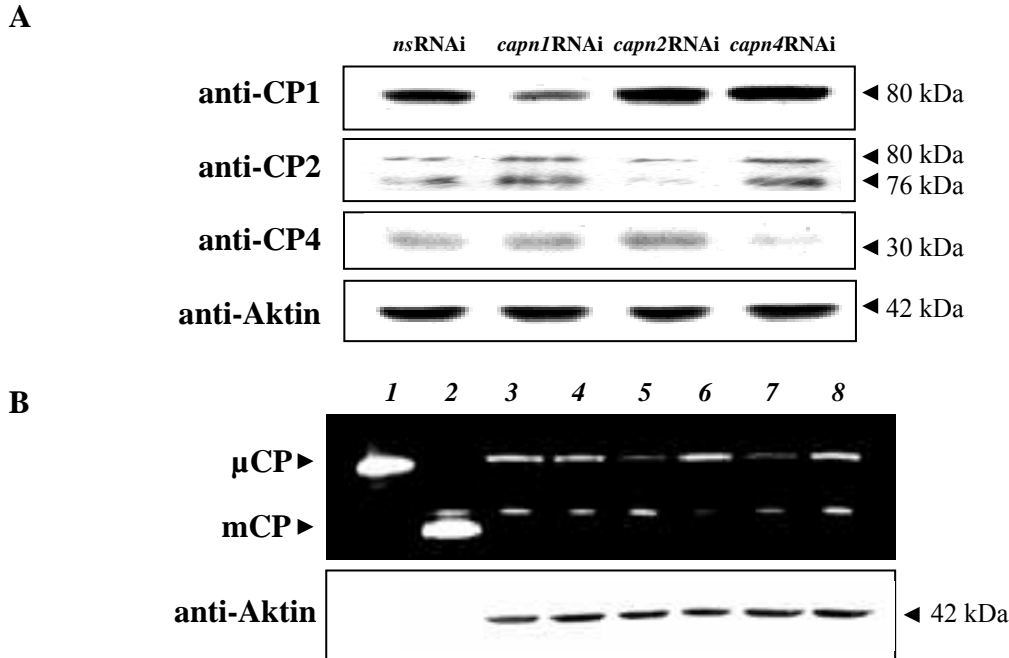


**Abbildung D.28 Zellvitalitätsanalyse nach Transfektion mit pRNAi-Vektoren.**

*Hek293 Flp-in T-Rex-Zellen* wurden mit pRNAi\_*ns* (2) und pRNAi\_*egfp* (3) transfiziert und das OAS mRNA-Niveau in Bezug auf Zellen, die mit pEGFP-C1 (1) transfiziert wurden, bestimmt (A). Darüber hinaus zeigte die Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsreagenz LF (B) oder mit LF-komplexierter pRNAi\_*ns* (C) keine Beeinflussung der Zellvitalität (FITC/PI-Färbung). Rote Rechtecke, lebende Zellen.

Dabei konnte mittels quantitativer RT-PCR keine relevante Erhöhung der OAS mRNA nachgewiesen und somit die Induktion einer Interferonantwort weitgehend ausgeschlossen werden. Ebenso war kein Auftreten von Apoptose oder Nekrose mittels Annexin V-FITC und PI-Färbung zu erkennen. Die lebenden Zellen einer nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten Probe (68 %) und einer mit pRNAi transfizierten Probe (72 %) sind mit einem roten Rechteck in Abbildung D.28 (B und C) gekennzeichnet.

Für die Etablierung der pRNAi-Vektoren gegen die Zielgene *capn1*, *capn2* und *capn4* wurden nun die jeweiligen shRNA-Kassetten in pRNAi eingebracht und HeLa-Zellen mit den Vektoren pRNAi\_ns, pRNAi\_capn1, pRNAi\_capn2, pRNAi\_capn4 und pRNAi\_egfp transfiziert. Die Zellen wurden nach 96 Stunden lysiert und mittels Western Blot-Analyse und Caseinzymographie charakterisiert (Abbildung D.29).

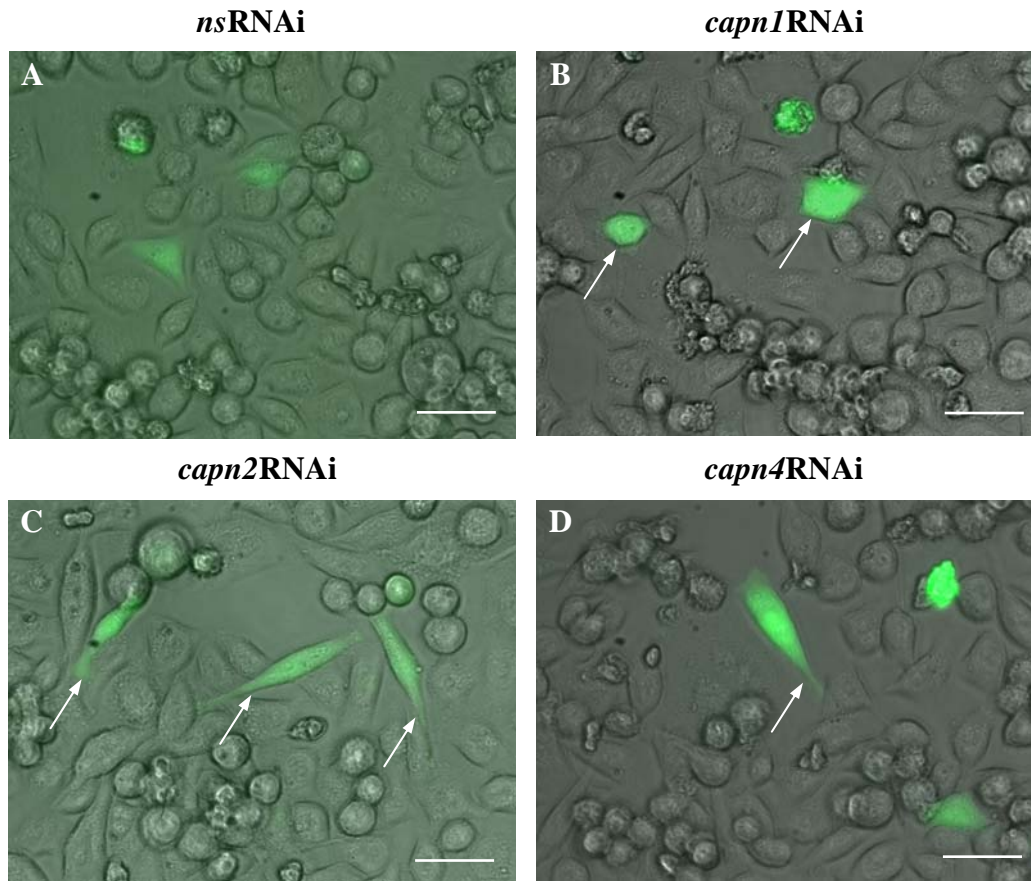


**Abbildung D.29 Protein-Expression und caseinolytische Aktivität bei pRNAi-induzierter Calpain-down-Regulierung.**

- A** Die Calpain-Expression in HeLa-Zellen wurde nach der Transfektion mit pRNAi\_ns (1), pRNAi\_capn1 (2), pRNAi\_capn2 (3) und pRNAi\_capn4 (4) mittels Western Blot-Analyse ermittelt.
- B** In der Caseinzymographie zeigte sich die spezifische Reduktion der entsprechenden Calpain-ähnlichen Aktivitäten: 1,  $\mu$ CP; 2, mCP; 3, HeLa untransfiziert; 4, nsRNAi; 5, capn1RNAi; 6, capn2RNAi; 7, capn4RNAi; 8, egfpRNAi. Als Kontrolle wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin dessen Expressionsniveau im Western Blot als Beladungskontrolle bestimmt.

Hierbei konnte eine deutliche Verringerung der entsprechenden Proteinmengen und damit einhergehend auch der Aktivitäten der Calpain-Isoformen CP1 und CP2 beobachtet werden. Bei *capn4*RNAi-Zellen mit der down-Regulierung der regulatorischen Untereinheit wurde auch eine Reduktion beider Calpain-ähnlichen Aktivitäten in der Caseinzymographie detektiert. Um eine möglicherweise ungleichmäßige Beladung der Gele auszuschließen, wurden die Lysate im Western Blot-Verfahren mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin analysiert. Wie in Abbildung D.29, B dargestellt, war die Reduktion Calpain-isoform-ähnlicher Aktivitäten in *capn4*RNAi-Zellen unabhängig von der aufgetragenen Proteinmenge.

Zusätzlich wurden schließlich die mit pRNAi\_ns, pRNAi\_capn1, pRNAi\_capn2 und pRNAi\_capn4 transfizierten HeLa-Zellen fünf Tage nach der Transfektion mikroskopisch ausgewertet (Abbildung D.30). Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (nsRNAi) eine ähnliche Morphologie wie bei den AS-Zelllinien *capn1*AS und *capn2*AS (siehe auch Abbildung D.6). Während Zellen mit *capn1*RNAi kleine, kompakte Strukturen aufwiesen, war bei *capn2*RNAi und auch bei *capn4*RNAi eine langgestreckte, spindelförmige Morphologie zu erkennen.



**Abbildung D.30 Morphologische Unterschiede bei pRNAi-transfizierte HeLa-Zellen.**

HeLa-Zellen wurden mit pRNAi\_ns (A), pRNAi\_capn1 (B), pRNAi\_capn2 (C) und pRNAi\_capn4 (D) transfiziert und nach fünf Tagen mikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich bei capn1RNAi eine ähnliche Morphologie wie bei capn1AS (klein und kompakt). capn2RNAi und capn4RNAi wiesen eine langgestreckte, spindelförmige Zellform auf (weiße Pfeile), vergleichbar mit capn2AS. Der Balken entspricht 30 µm.

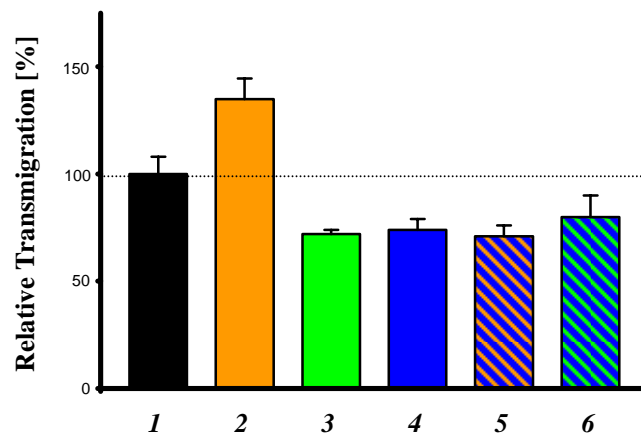
### D.1.2.3 Isoformspezifisches Migrationsverhalten von Calpain-RNAi-Zellen

Zur weiteren Aufklärung der Bedeutung der einzelnen Calpain-Isoformen, insbesondere auch von CP4 (identische kleine Untereinheit von µCP und mCP) bei der Zellmigration wurden nun die mit pRNAi\_ns, pRNAi\_capn1, pRNAi\_capn2 und pRNAi\_capn4 einzeln oder in Kombination transfizierten HeLa-Zellen im Matrigel-Transmigrationsassay analysiert.

Dabei wurde zunächst nach erfolgter Transfektion mit pRNAi-Plasmiden die Reduktion der entsprechenden Calpain-Isoformen vor Beginn des Transmigrationsversuches überprüft. Die Transfektionseffizienz betrug bei allen pRNAi-Varianten ungefähr 50 %, wodurch die down-Regulation leicht (capn1RNAi) bis deutlich (capn2RNAi) weniger ausgeprägt war als im AS-Ansatz (siehe Kapitel D.1.1.1). Die Zellen wurden danach in serumfreiem Medium aufgenommen und auf die Matrigel-beschichteten Filtermembranen gebracht. In serumfreiem Medium waren die transfizierten Zellen nicht zur Proliferation in der Lage und zeigten während des Zeitraums der Messung von 24 Stunden keine Induzierung des Zelltodes.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen ausgezählt und in Bezug zur nsRNAi-Kontrolle normiert. Dabei konnte bei CP1-reduzierten Zellen (capn1RNAi) eine erhöhte Transmigration von 140 % der Kontrolle festgestellt werden. Dagegen war die Zahl transmigrierter capn2RNAi- ( $72 \pm 2$  %) bzw. capn4RNAi-Zellen ( $74 \pm 5$  %) vermindert. Interessanterweise erbrachte die Kotransfektion von capn2/capn4RNAi ( $80 \pm 10$  %) keine weitere Reduktion der

Transmigrationsrate, während durch die Kotransfektion von *capn1/capn4RNAi* ( $71 \pm 5 \%$ ) die bei *capn1RNAi* festgestellte Erhöhung wieder auf das Niveau von *capn4RNAi* alleine vermindert wurde (Abbildung D.31). Trotz eines unterschiedlichen Niveaus der *down*-Regulation von CP1 und CP2 konnten insgesamt gesehen mit dem RNAi-Ansatz die Ergebnisse bei den AS-Zellen bestätigt werden, die eine erhöhte Transmigrationsfähigkeit bei einer *down*-Regulierung von CP1 und eine erniedrigte Transmigration bei einer Suppression von CP2 zeigten (siehe auch Abbildung D.17).



**Abbildung D.31 Isoformspezifisches Migrationsverhalten von Calpain-pRNAi-Zellen im Matrigel-Transmigrationsassay.**

Mit pRNAi<sub>ns</sub> (schwarz, 1), pRNAi<sub>capn1</sub> (orange, 2), pRNAi<sub>capn2</sub> (grün, 3), pRNAi<sub>capn4</sub> (blau, 4) transfizierte Hela-Zellen sowie mit pRNAi<sub>capn1/capn4</sub> (orange-blau, 5) und pRNAi<sub>capn2/capn4</sub> (grün-blau, 6) kotransfizierte Zellen wurden hinsichtlich ihrer Transmigrationsfähigkeit untersucht. Dabei zeigte *capn1RNAi* eine erhöhte Migrationsrate im Matrigel-Transmigrationsassay, während diese bei *capn2RNAi*, *capn4RNAi*, *capn1/capn4RNAi* und *capn2/capn4RNAi* vermindert war.

## D.2 Identifizierung von isoformspezifischen Calpain-Substraten bei der Zellmigration

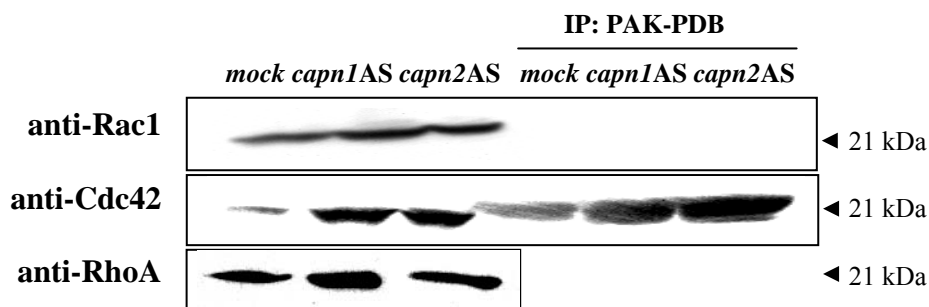
Nachdem ein isoformspezifisches unterschiedliches Verhalten bei mehreren Zellfunktionen, speziell bei der Migration, nach der *down*-Regulierung von CP1 bzw. CP2 detektiert werden konnte, lag es nahe, nach assoziierten isoformspezifischen Substraten zu suchen, deren Calpain-abhängige Spaltung für die oben beschriebenen Zellfunktionsänderungen als ursächlich betrachtet werden kann. Im Hinblick auf die Untersuchungen des Migrationsverhaltens von Tumorzellen als Schwerpunkt der vorliegenden Promotionsarbeit wurden aus der Vielzahl der möglichen Faktoren Proteine der RhoA-Familie und des Integrin-assoziierten Signaltransduktionsmechanismus für eine genauere Analyse ausgewählt.

### D.2.1 Proteine der RhoA-Familie als mögliche Calpain-Substrate

Als potentielle Calpain-Substrate werden schon seit längerem kleine GTPasen der RhoA-Familie intensiv diskutiert, die für die Bildung neuer Lamellipodien- und Filopodien-Strukturen verantwortlich gemacht werden (KULKARNI *et al.*, 1999). Zudem konnte kürzlich in einer Studie eine Erhöhung der Rac1- und Cdc42-Aktivität durch die Hemmung von Calpain beobachtet werden (LOKUTA *et al.*, 2003). Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten

daher bei den AS-Zellen *capn1AS* und *capn2AS* die Proteinexpressionen der inaktiven sowie der GTP-gebundenen aktiven Form von Rac1 und Cdc42 überprüft werden.

Sowohl in Western Blot-Analysen der Gesamtzelllysate als auch der Fraktion, die durch Immunpräzipitation (IP) von GTP-gebundenem (aktivem) Rac1 und Cdc42 mit PAK-PDB-GST-Sepharose gewonnen wurde, zeigte sich bei *capn1AS* und *capn2AS* im Vergleich zur *mock*-Kontrolle eine Verstärkung der Banden für Cdc42 und dessen GTP-gebundener Form. Bei inaktivem Rac1 wurden dagegen nahezu keine Unterschiede bei der Expression in den Calpain-AS-Zellen und der *mock*-Kontrolle festgestellt. Darüber hinaus konnte auch in keiner der Zelllinien GTP-gebundenes Rac1 detektiert werden. Interessanterweise war im Gegensatz zu *mock* und *capn2AS* bei *capn1AS* eine leichte Intensivierung des Signals mit einem anti-RhoA Antikörper zu erkennen (Abbildung D.32). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vor allem Cdc42 und seine GTP-gebundene Form Substrate von CP1 und CP2 darstellen könnten, während RhoA als mögliches isoformspezifisches Substrat von CP1 anzusehen ist.



**Abbildung D.32 Akkumulierung von Proteinen der RhoA-Familie in AS-Zellen.**

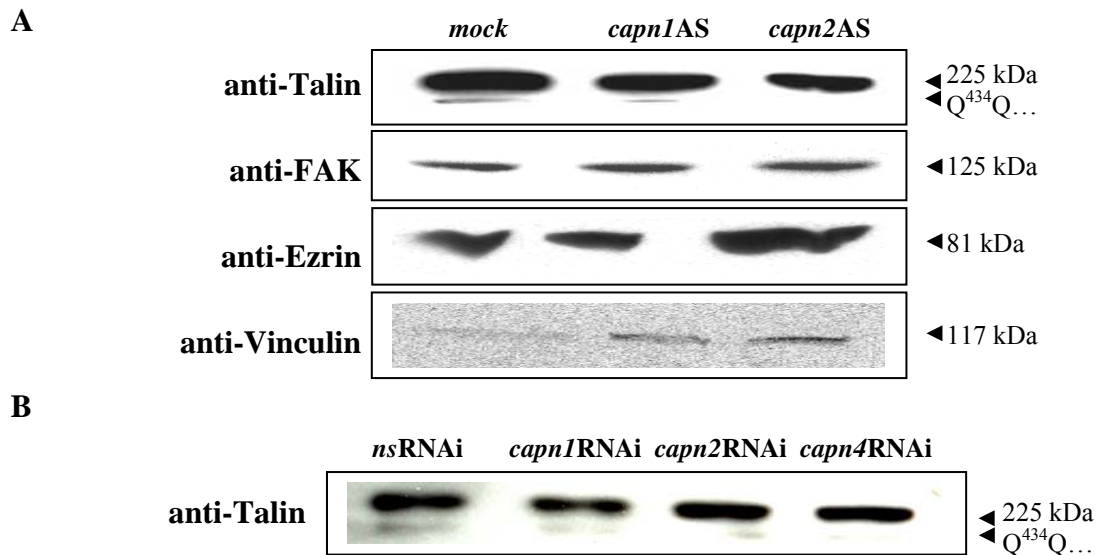
Gesamtzelllysate von *mock*, *capn1AS* und *capn2AS* wurden direkt oder nach Immunpräzipitation (IP) mit PAK-PDB-GST-Sepharose im Western Blot-Verfahren mit anti-Rac1, anti-Cdc42 und anti-RhoA analysiert. Dabei konnte mit anti-Cdc42 eine verstärkte Bande bei *capn1AS* und *capn2AS* sowie eine erhöhte Expression von RhoA bei *capn1AS* detektiert werden. Immunpräzipitierte Formen waren nur für Cdc42 nachweisbar und zeigten ebenfalls eine Erhöhung bei *capn1AS* und *capn2AS*.

### D.2.2 Talin als potentielles spezifisches Substrat von mCP

Um Faktoren der Integrin-assoziierten Signaltransduktion als mögliche isoformspezifische Substrate zu detektieren, wurden im Western Blot-Verfahren Gesamtzelllysate der AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* sowie der *mock*-Kontrolle durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurden die Membranen mit Antikörpern gegen die Proteine der fokalen Adhäsionsmoleküle Talin, FAK, Ezrin und Vinculin inkubiert.

Das Fehlen des durch Calpainolyse erzeugten, von Otey *et al.* bereits beschriebenen Talin-Spaltproduktes (OTEY, *et al.*, 1990) bei *capn2AS* deutete erstmals auf Talin als mCP-spezifisches Substrat hin (Abbildung D.33, A). Bei FAK konnte kein Unterschied in der Proteinexpression festgestellt werden. Zudem zeigte sich ein intensiveres Signal der Banden bei *capn2AS* mit anti-Ezrin und bei *capn1AS* und *capn2AS* mit anti-Vinculin im Vergleich zur *mock*-Kontrolle.

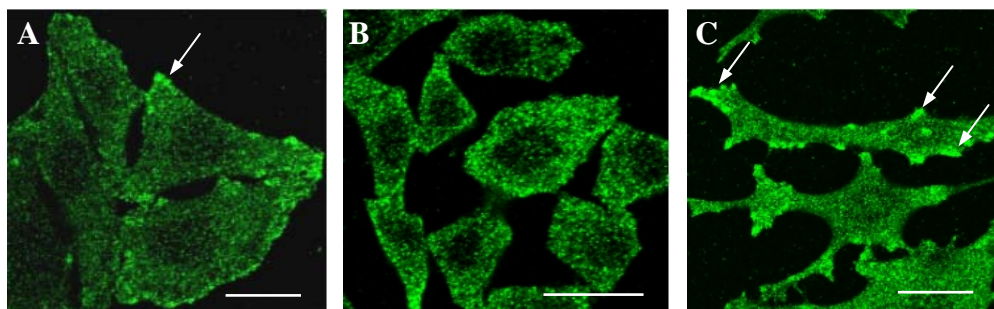
In einem weiteren Ansatz wurde nun auch in *capn1RNAi*-, *capn2RNAi*- und *capn4RNAi*-Zellen das Talin-Profil im Vergleich zur *nsRNAi*-Kontrolle mittels Western Blot analysiert. Auch hier war eine verminderte Talin-Spaltprodukt-Bande bei *capn2RNAi* und darüber hinaus noch bei *capn4RNAi* erkennbar, was wiederum auf Talin als spezifisches Substrat von m-Calpain hinwies, da das komplette mCP-Molekül ja aus CP2 und CP4 besteht.



**Abbildung D.33 Integrin-assoziierte Signaltransduktions- und Strukturmoleküle als potentielle isoformspezifische Calpain-Substrate.**

- A** Gesamtzelllysate von *mock*, *capn1AS* und *capn2AS* wurden im Western Blot-Verfahren mit Antikörpern gegen Talin, FAK, Ezrin und Vinculin analysiert. Dabei deutete das Fehlen des proteolytischen Talin-Spaltproduktes (Q<sup>434</sup>Q...) bei *capn2AS* auf Talin als spezifisches mCP-Substrat hin.
- B** Ein weiterer Hinweis für die spezifische Spaltung von Talin durch mCP zeigte sich bei der Analyse der Gesamtzelllysate von *nsRNAi*, *capn1RNAi*, *capn2RNAi* und *capn4RNAi* mit einem Antikörper gegen Talin, da das Talin-Spaltprodukt bei *capn2RNAi* und *capn4RNAi* verringert vorlag.

Für anschließende Lokalisationsstudien von Talin in *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurden diese mit anti-Talin und anti-mouse-FITC-Konjugat gefärbt und die subzelluläre Lokalisation der Immunofluoreszenz mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert (Abbildung D.34).



**Abbildung D.34 Lokalisation von Talin in AS-Zellen.**

Mittels Immunofluoreszenz wurde die Lokalisation von Talin bei *mock* (A), *capn1AS* (B) und *capn2AS* (C) analysiert. Dabei wurden Akkumulationen von Talin an fokalen Adhäsionen bei *mock* und *capn2AS* gefunden (weiße Pfeile), die jedoch bei den CP2-verminderten Zellen gehäuft auftraten. Diese deutliche Anhäufung von Talin fehlte dagegen bei *capn1AS*. Der Balken entspricht 5  $\mu$ m.

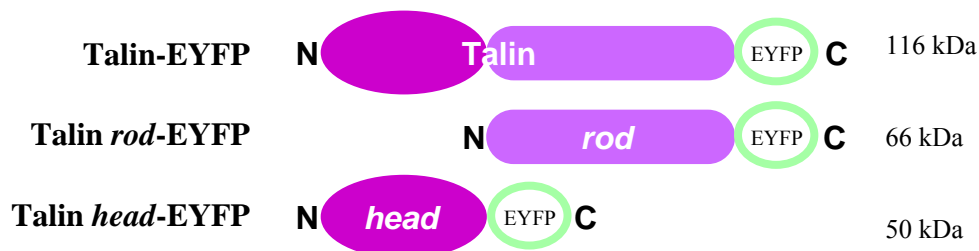
Im Gegensatz zu *mock*, wo vereinzelt eine verstärkte Fluoreszenz an membrannahen Strukturen zu sehen war, zeigte *capn2AS* mit einem Antikörper gegen Talin eine Akkumulation intensiv gefärbter Bereiche an potentiellen fokalen Adhäsionen. Derartige Anhäufungen konnten bei *capn1AS* nicht gefunden werden, wo vielmehr eine diffuse Verteilung im zytoplasmatischen Kompartiment zu sehen war.



### D.2.2.1 Herstellung und Charakterisierung von verkürzten Talin-Varianten

Talin konnte bei der vorangegangenen proteinchemischen Untersuchung von fokalen Adhäsionsmolekülen unter anderem als mögliches m-Calpain Substrat identifiziert werden. Darüber hinaus zeigte sich in unseren Experimenten eine gestörte Liganden-Bindungsaffinität von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bei *capn2AS*-Zellen (Abbildung D.20). Da in der Literatur die Hypothese einer Regulierung der Integrin-Aktivität, welche einen essentiellen Faktor der Zellmigration darstellt, durch Talin intensiv diskutiert wird (CALDERWOOD *et al.*, 2002), stellte sich uns nunmehr die Frage nach der Bedeutung der Talin-Spaltung durch Calpain bei der Zellmigration. Zur Klärung dieser Problematik sollte vor allem die Herstellung diverser Talin-Varianten beitragen. So sollte zunächst ein verkürztes Talin-Konstrukt (Aminosäure 1 – 1071) generiert werden, welches dennoch ausreichend für die Aktivierung von Integrin  $\alpha_{Iib}\beta_3$  war (CALDERWOOD *et al.*, 2002). Ausgehend von dieser anscheinend noch funktionellen verkürzten Variante sollten zwei weitere Derivate, die physiologisch bei der proteolytischen Spaltung von Talin durch mCP auftreten ( $Q^{433}$ - $Q^{434}$ ), als Fluoreszenzfusionsproteine hergestellt werden. Diese umfassen die Talin-Sequenzbereiche Aminosäure 1 – 434 bzw. Aminosäure 434 – 1071. Durch die Transfektion entsprechender Vektorkonstrukte wurden in HeLa-Zellen Talin-Proteine mit COOH-terminal fusioniertem EYFP exprimiert (Abbildung D.35).

Im Folgenden werden das verkürzte Talin-Konstrukt (Aminosäure 1 – 1071) nur als Talin und die Spaltprodukte von Aminosäure 1 – 434 als Talin *head* sowie von Aminosäure 434 – 1071 als Talin *rod* bezeichnet.



**Abbildung D.35** Schematische Darstellung der drei verkürzten Talin-Varianten *Talin-EYFP*, *Talin rod-EYFP* und *Talin head-EYFP* mit Angabe der entsprechenden Molekulargewichte.

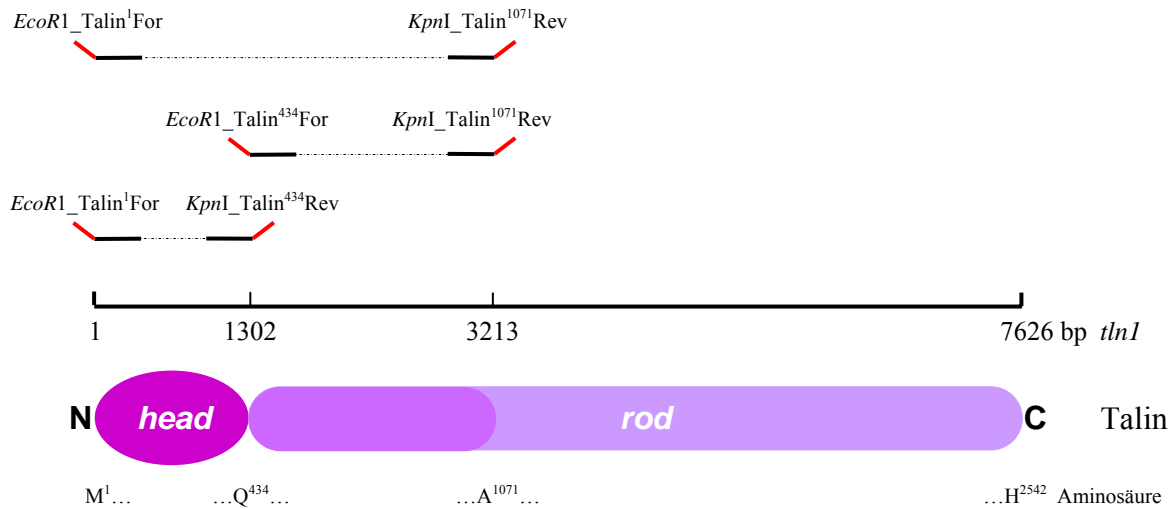
#### D.2.2.1.1 Herstellung der Talin-Varianten

Für die Generierung der Fluoreszenzfusions-Talin-Varianten wurde das Plasmid pBlue-script+*tln1\_wt* verwendet (hergestellt von Dr. Richard O. Hynes). Da bis zu Beginn unserer Studie keine vollständig klonierte humane Sequenz von Talin 1 verfügbar war, wurde der Expressionsvektor pBluescript mit der eingebauten kodierenden Sequenz von murinem Talin 1, *tln1*, (NM\_011602) verwendet. Aufgrund einer hohen Sequenzhomologie (98,6 %, siehe Anhang) zwischen dem humanen und murinen Talin 1 sollten mögliche speziesspezifische Nebeneffekte in unserem Modell weitgehend ausgeschlossen werden können.

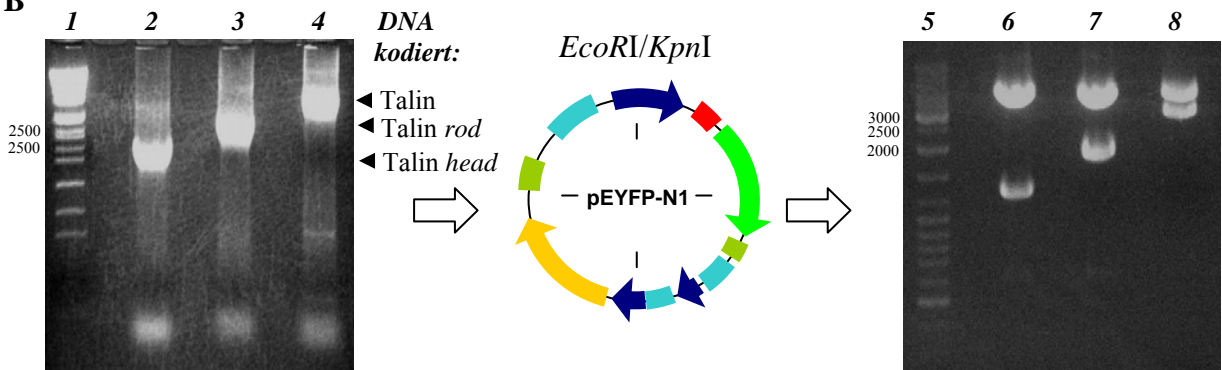
Die kodierenden Sequenzen für die drei verkürzten Talin-Varianten Talin, Talin *head* und Talin *rod* wurden, wie in der Abbildung D.36 dargestellt, mittels PCR generiert (95 °C/5 Min; [95 °C/1 Min → 60 °C/1 Min → 72 °C/2 Min] x 30 Zyklen; 72 °C/7 Min; 4 °C/∞). Dabei wurden folgende Primerpaare verwendet: *EcoR1\_Talin*<sup>1</sup>For und *KpnI\_Talin*<sup>1071</sup>Rev für Talin; *EcoR1\_Talin*<sup>1</sup>For und *KpnI\_Talin*<sup>434</sup>Rev für Talin *head*; *EcoR1\_Talin*<sup>434</sup>For und *KpnI\_Talin*<sup>1071</sup>Rev für Talin *rod* (Abbildung D.36, A). Die PCR-Fragmente wurden mit den

Endonukleasen *EcoRI* und *KpnI* geschnitten, gereinigt und in den Fluoreszenzprotein-Vektor pEYFP-N1 ligiert (Abbildung D.36, B). Die Vektoren wurden in kompetente XL-10 Gold *E. coli* Zellen transformiert und die Richtigkeit des Einbaus mittels Sequenzierung bestätigt.

**A**



**B**



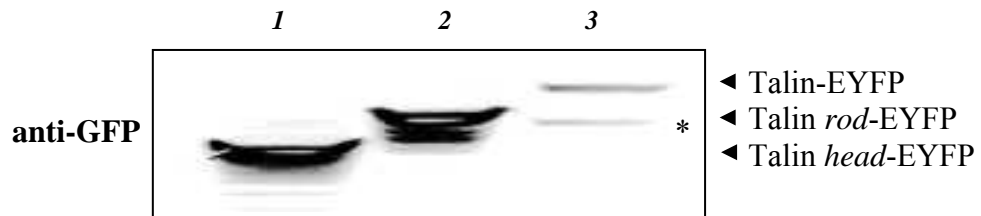
**Abbildung D.36 Herstellung der verkürzten Talin-Varianten.**

- A** Schematische Darstellung der PCR-vermittelten Amplifizierung der kodierenden Sequenzen für die verkürzten Talin-Varianten Talin, Talin head und Talin rod. Neben der kodierenden Sequenz des murinen Talin 1-Gens und den Amplifizierungsprimern für die PCR ist eine schematische Darstellung des Talin-Proteins gezeigt. Die Bezeichnung der Primer richtet sich nach den entsprechenden Aminosäuren.
- B** Die kodierenden Sequenzen der verkürzten Talin-Varianten Talin head (2, 1307 bp), Talin rod (3, 1916 bp) und Talin (4, 3218 bp) wurden mittels PCR amplifiziert, mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und in den Expressionsvektor pEYFP-N1 ligiert. Eine anschließende analytische Restriktion bestätigte den korrekten Einbau der gewünschten Sequenzen.
- 1, 5 Marker; 6, pEYFP-N1+tln head; 7, pEYFP-N1+tln rod; 8, pEYFP-N1+tln.



### D.2.2.1.2 Lokalisation der verkürzten Talin-Varianten in HeLa-Zellen

Die verkürzten Talin-Varianten Talin-EYFP, Talin *rod*-EYFP und Talin *head*-EYFP wurden zunächst in *mock*-transfizierten HeLa-Zellen überexprimiert. Dabei zeigte die Überexpression der verkürzten Talin-Variante Talin-EYFP das typische proteolytische Talin *rod*-Spaltprodukt bei der Western Blot-Analyse (Abbildung D.37).

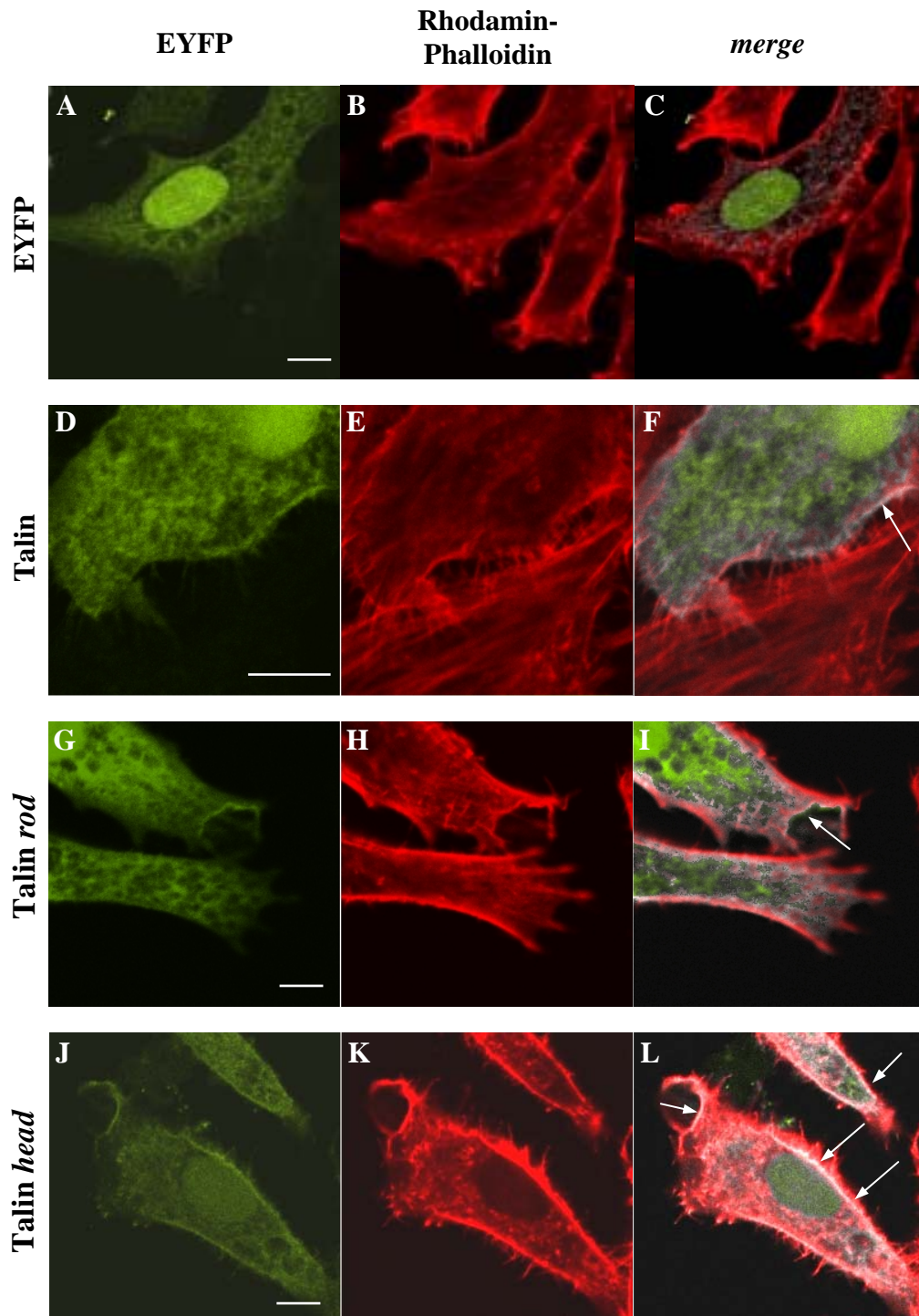


**Abbildung D.37 Überexpression der Talin-Varianten in der mock-Kontrolle.**

Mit *pEYFP-N1+tln head* (1), *pEYFP-N1+tln rod* (2) und *pEYFP-N1+tln* (3) transfizierte HeLa-Zellen wurden nach 48 Stunden für die anschließende Western Blot-Analyse lysiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GFP inkubiert (erkennt auch YFP-Derivate). Dabei konnte das Talin *rod*-Spaltprodukt (\*) detektiert werden.

Zusätzlich wurden die transfizierten Zellen für die Analyse der subzellulären Lokalisation von Talin-EYFP, Talin *rod*-EYFP und Talin *head*-EYFP im Vergleich zur Kontrolle EYFP nach 48 Stunden mit Rhodamin-markiertem Phalloidin gefärbt und mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie ausgewertet (Abbildung D.38).

Die Überlappung (*merge*) der beiden Farbkanäle resultierte in einer weißen Färbung und zeigte so die Assoziation der verschiedenen Talin-Varianten mit dem F-Aktin-Zytoskelett. Im Gegensatz zu EYFP, welches uniform im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert war, konnten bei den drei verkürzten Talin-Varianten Talin-EYFP, Talin *rod*-EYFP und Talin *head*-EYFP eine Kolokalisation mit dem F-Aktin-Netzwerk, vornehmlich an den äußeren Grenzen der Zelle detektiert werden. Darüber hinaus war im Gegensatz zu Talin *head*-EYFP, welches hauptsächlich an Membranstrukturen beobachtet werden konnte, auch eine diffuse EYFP-Färbung von Talin-EYFP und Talin *rod*-EYFP im Zytoplasma nachweisbar.



**Abbildung D.38** Kolokalisation von Talin-Varianten mit dem F-Aktin-Zytoskelett von HeLa-Zellen.

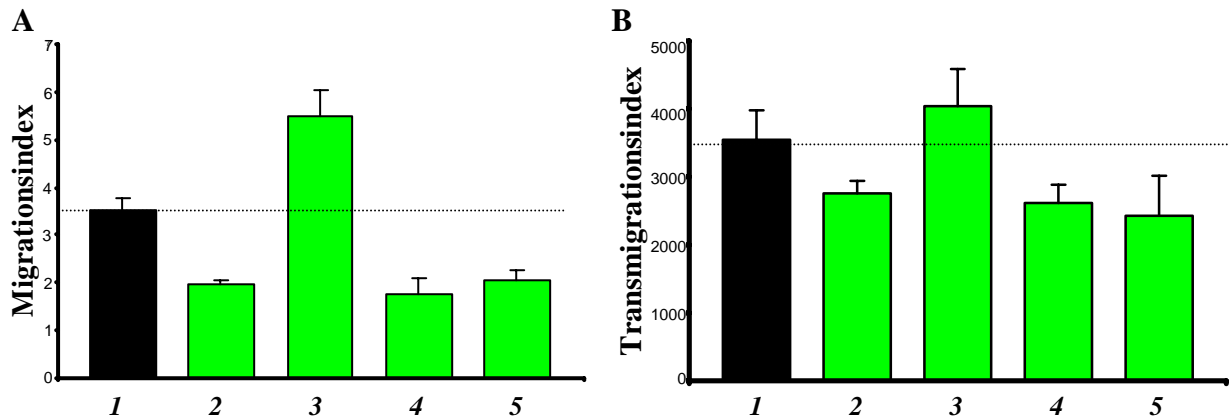
HeLa-Zellen wurden mit pEYFP-N1, pEYFP-N1+tln, pEYFP-N1+tln rod und pEYFP-N1+tln head transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin (F-Aktin-Zytoskelett) gefärbt.

Eine Kolokalisation der Talin-Varianten mit F-Aktin ist durch die weiße Färbung (weiße Pfeile) zu erkennen. pEYFP-N1: EYFP (A), Rhodamin-Phalloidin (B), merge (C); pEYFP-N1+tln: EYFP (D), Rhodamin-Phalloidin (E), merge (F); pEYFP-N1+tln rod: EYFP (G), Rhodamin-Phalloidin (H), merge (I); pEYFP-N1+tln head: EYFP (J), Rhodamin-Phalloidin (K), merge (L). Talin head-EYFP konnte dabei hauptsächlich an Membranstrukturen detektiert werden.

Der Balken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### D.2.2.1.3 Talin-Varianten bei der Zellmigration

Zur Klärung der Bedeutung der verkürzten Talin-Varianten bei der Zellmigration wurden nun *mock*- und *capn2AS*-Zellen mit pEYFP-N1, pEYFP-N1+*tln head*, pEYFP-N1+*tln rod* und pEYFP-N1+*tln* transfiziert und nach 48 Stunden in Migrations- und Transmigrationsexperimenten, wie in Kapitel C.2.3.12 beschrieben, eingesetzt (Abbildung D.39).



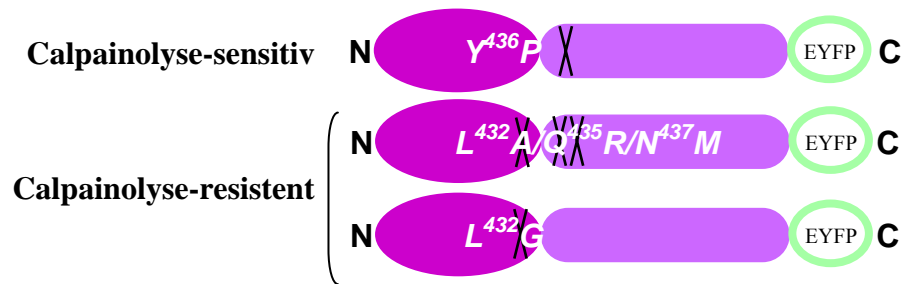
**Abbildung D.39 Migration und Transmigration von *capn2AS*-Zellen nach Transfektion mit Talin-Varianten.** Die Zelllinien *mock* (schwarz) und *capn2AS* (grün) wurden zur Kontrolle mit pEYFP-N1 (1, 2) transfiziert. Darüber hinaus wurden *capn2AS*-Zellen mit pEYFP-N1+*tln head* (3), pEYFP-N1+*tln rod* (4) und pEYFP-N1+*tln* (5) transfiziert und nach 48 Stunden in Migrations- (A) und Transmigrationsexperimenten (B) analysiert. Die Überexpression von Talin head-EYFP in *capn2AS* zeigte eine Rekonstitution der Migrations- und Transmigrationskapazität.

Die mittels des Durchflusszytometers bestimmten Transfektionseffizienzen lag bei den verschiedenen Talin-Varianten zwischen 30 und 50 %. Während die Überexpression von Talin *rod*-EYFP keine Veränderung der Migrations- und Transmigrationsfähigkeit im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen zeigte, konnte im Gegensatz dazu die Überexpression von Talin *head* die Migration (Abbildung D.39, A3) und Transmigration (Abbildung D.39, B3) rekonstituieren bzw. sogar zum Teil deutlich erhöhen (signifikant für Abbildung D.39).

### D.2.2.2 Herstellung und Charakterisierung Calpainolyse-sensitiver und -resistenter Talin-Mutanten

Für die Bestätigung der Hypothese, dass die Hydrolyse von Talin und somit die Generierung des Talin *head* durch mCP ausreichend für die Normalisierung des Migrationsverhaltens ist, wurden Calpainolyse-sensitive und -resistente Talin-Mutanten durch Mutagenese-PCR erzeugt (siehe C.2.1.3).

Die verschiedenen Talin-Mutanten wurden auf der Grundlage einer Studie von Tompa *et al.* (TOMPA *et al.*, 2004) und mittels dynamischen Berechnungen, wie im folgenden Kapitel beschrieben, entwickelt. Während der Anfertigung unserer Studie wurden von einer weiteren Gruppe ähnliche Versuche durchgeführt (FRANCO *et al.*, 2004). Die dabei eingeführte Mutation L<sup>432</sup>G im Talin-Gen wurde auch von uns als Kontrolle bei den verkürzten Talin-Varianten verwendet. Die Abbildung D.40 zeigt die schematische Darstellung der exprimierten Genprodukte der Calpainolyse-sensitiven Talin-Mutante Y<sup>436</sup>P und die beiden Calpainolyse-resistenten Mutanten L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und L<sup>432</sup>G.



**Abbildung D.40 Schematische Darstellung der Talin-Mutanten mit den eingefügten Mutationen.**

Die Mutationen in den Calpainolyse-sensitiven ( $Y^{436}P$ ) und -resistenten ( $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  und  $L^{432}G$ ) Talin-Mutanten sind als schwarze Kreuze gekennzeichnet.

### D.2.2.2.1 Modellierung Calpainolyse-sensitiver und -resistenter Talin-Mutanten

In der kürzlich von Tompa *et al.* publizierten Arbeit wurden bereits veröffentlichte Daten zur Substratspezifität von Calpain mit 106 unterschiedlichen Spaltstellen zusammengefasst und nach Aminosäure-Präferenzen in der Nähe der Spaltstelle in den Positionen P4 bis P7' analysiert (TOMPA *et al.*, 2004) (Tabelle D.2).

**Tabelle D.2 Häufigkeit der Aminosäurereste in den Positionen P4 – P7' für 106 Calpain-Substrate und gewählte Aminosäuremutationen für die hergestellten Talin-Mutanten**  
[modifiziert und erweitert nach Tompa *et al.* (TOMPA *et al.*, 2004)]

Aminosäure	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'	P7'
Trp	0,00	<b>2,34<sup>a</sup></b>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>3,12<sup>a</sup></b>	0,79	0,00	<b>2,38<sup>a</sup></b>	0,79
Tyr	0,90	0,00	0,30	<b>2,69<sup>a</sup></b>	0,00	0,30	<b>0,60</b>	0,60	1,81	<b>1,52<sup>b</sup></b>	0,30
Phe	0,23	0,23	0,23	1,84	0,46	0,46	0,23	1,39	0,00	0,94	1,17
Leu	0,59	0,59	<b>2,97<sup>a</sup></b>	0,59	0,59	0,40	0,20	0,40	0,90	0,60	1,01
Ile	0,32	1,13	0,81	0,16	<b>0,65<sup>b</sup></b>	0,65	0,97	0,33	0,33	0,33	0,99
Val	0,71	<b>1,57</b>	<b>2,00<sup>a</sup></b>	0,14	0,71	0,71	0,57	1,58	1,01	<b>1,16</b>	0,29
Ala	1,11	0,74	<b>0,12</b>	0,25	1,73	1,36	0,99	1,00	0,75	0,88	0,88
Gly	0,69	0,83	<b>0,14</b>	1,24	0,69	1,24	0,55	1,25	1,53	0,84	<b>1,26</b>
Ser	1,20	1,60	0,93	0,80	<b>3,33<sup>a</sup></b>	1,87	0,80	1,08	1,88	1,36	1,49
Thr	<b>2,03<sup>a</sup></b>	1,02	<b>2,71<sup>a</sup></b>	<b>1,86<sup>b</sup></b>	1,86	0,68	0,85	1,71	1,03	1,55	0,69
Pro	1,54	2,32	0,77	0,58	0,19	<b>2,89<sup>a</sup></b>	<b>5,59<sup>a, b</sup></b>	<b>2,92<sup>a, b</sup></b>	1,75	1,77	1,18
Asp	0,72	0,36	0,54	0,36	0,18	0,72	0,36	0,73	0,73	0,92	0,73
Glu	1,31	1,60	0,73	0,44	0,73	1,31	0,73	0,29	0,88	0,89	0,89
Gln	1,68	0,48	0,72	<b>0,96</b>	<b>1,20</b>	<b>1,68</b>	1,44	0,97	0,48	1,22	0,73
Asn	1,08	0,65	1,30	0,65	0,43	0,65	0,65	<b>1,53</b>	1,75	0,88	0,66
Lys	1,11	1,42	0,47	<b>2,84<sup>a</sup></b>	1,11	1,42	1,42	0,96	0,96	0,81	1,45
Arg	1,45	1,09	0,36	<b>2,54<sup>a</sup></b>	1,82	<b>0,36</b>	0,91	0,55	<b>0,92</b>	0,74	<b>2,22<sup>a, b</sup></b>
His	1,68	0,84	0,00	1,26	0,42	0,42	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85
Cys	0,00	0,00	1,75	0,00	0,00	0,58	0,00	0,59	1,18	<b>2,37<sup>a</sup></b>	0,00
Met	0,80	0,40	0,40	1,59	0,80	0,40	1,19	<b>0,00</b>	0,00	0,00	1,22

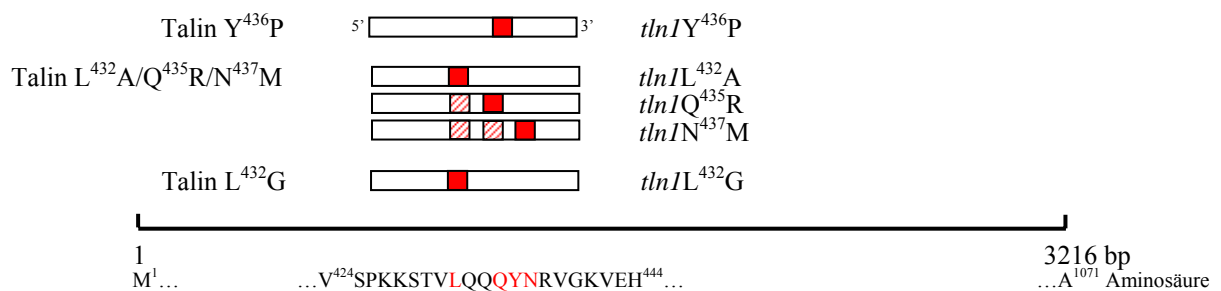
Die Zahlen geben die auf die Frequenz der Aminosäure in Swiss-Prot und TrEMBL normalisierten Häufigkeiten an. <sup>a</sup>Werte über 2.00 sind fett gedruckt; <sup>b</sup>Werte entsprechend dem Konsensus-Calpastain-Inhibitorsegment in den Positionen P1' – P7' (z. B. TIPPXYR) sind unterstrichen. Die Aminosäure Pro mit der höchsten Präferenz in Calpain-Spaltungssequenzen in P3' wurde für die Talin-Mutante  $Y^{436}P$ -EYFP herangezogen und ist rot hinterlegt. Gelb unterlegt sind die Aminosäuren für die Calpainolyse-resistenten Talin-Mutanten  $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  und  $L^{432}G$ . Die Aminosäuren der Talin-Wildtyppolypeptidkette sind blau unterlegt.

Rot gestrichelte Linie, Calpain-Spaltstelle.

Anhand der in Tabelle D.2 aufgezeigten Präferenzen von Aminosäure-Resten in der Umgebung der Spaltstelle für eine möglicherweise erhöhte oder erniedrigte Spaltung eines Calpain-Substrates wurden die zu mutierenden Aminosäuren der Talin-Polypeptidkette ausgewählt. Dabei sollten die Positionen P1 und P1' der Talin-Mutanten nicht verändert werden.

Mittels der zielgerichteten Mutagenese wurden Talin-Mutanten generiert, die für die Calpain-Spaltung sensitiv ( $Y^{436}P$ ) oder resistent ( $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$ ) sind (Abbildung D.41). Als PCR-Vorlage diente der Expressionsvektor pEYFP-N1+*tln*. Die einzelnen Mutagenesereaktionen wurden mit den folgenden Primern unter den Bedingungen 95 °C/30 s; [95 °C/30 s → 55 °C/1 Min → 68 °C/13 Min] x 30 Zyklen; 4 °C/∞ durchgeführt: pEYFP-N1+*tln*  $Y^{436}P$  mit *tln*Y<sup>436</sup>P; pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  mit *tln*IL<sup>432</sup>A, *tln*IQ<sup>435</sup>R und *tln*IN<sup>437</sup>M; pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}G$  mit *tln*IL<sup>432</sup>G. Für die PCR-Reaktion wurden 10 ng zu mutierendes Plasmid (pEYFP-N1+*tln*) und 200 ng Mutageneseprimer mit einer Stocklösung aus PCR-Puffer, dNTPs und *Pfu*Turbo Polymerase in einem Volumen von 25 µl verdünnt.

Nach der PCR-Reaktion wurde 1 µl (10 U) *Dpn*I der Reaktionsmischung zugegeben und zum Verdau der methylierten DNA bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden 2 µl jedes Reaktionsansatzes, wie in Kapitel C.2.2.2 beschrieben, in XL-10 Gold kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

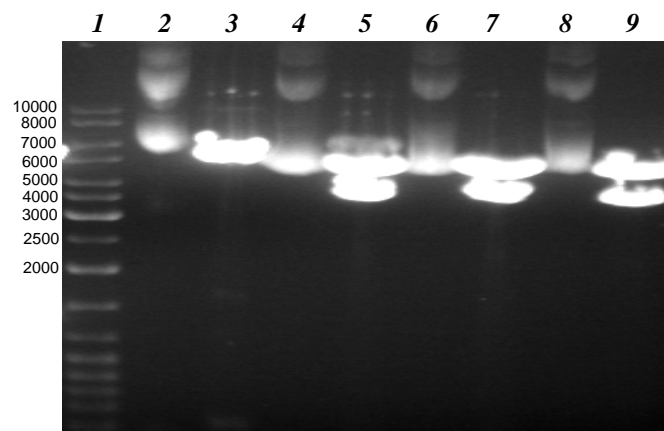


**Abbildung D.41 Schematische Darstellung der Mutageneseschritte für die Herstellung der Calpainolyse-sensitiven ( $Y^{436}P$ ) bzw. -resistenten ( $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  und  $L^{432}G$ ) Talin-Mutanten.**

Rot ausgefüllte Quadrate stellen die zu mutierenden Codons dar. Bei Mehrfachmutationen musste auf bereits mutierte Codons geachtet werden (rot schraffierte Quadrate). Die Größe der Primer ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.

Weitere Details siehe Text.

Abbildung D.42 zeigt die abschließende analytische Restriktion mit *Eco*RI und *Kpn*I (generiert Vektorrückgrad, 4712 bp und *insert*, 3218 bp) im Vergleich zu den ungeschnittenen generierten Plasmiden pEYFP-N1, pEYFP-N1+*tln*  $Y^{436}P$ , pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  und pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}G$  und bestätigt die erfolgreiche Klonierung.

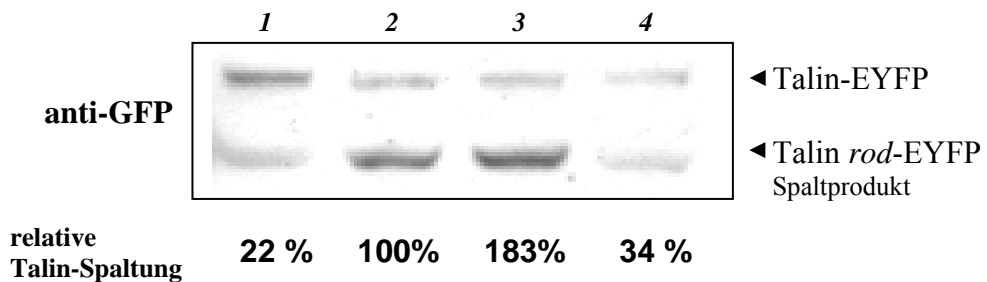


**Abbildung D.42 Analytische Restriktionsanalyse der hergestellten Talin-Mutanten-Vektoren.**

Folgende Plasmide wurden ungeschnitten (2, 4, 6, 8) oder mit *Eco*RI und *Kpn*I verdaut (3, 5, 7, 9) mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt: Marker (1), pEYFP-N1 (2, 3); pEYFP-N1+*tln*  $Y^{436}P$  (4, 5); pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}A/Q^{435}R/N^{437}M$  (6, 7); pEYFP-N1+*tln*  $L^{432}G$  (8, 9).

### D.2.2.2.2 Funktionalitätsüberprüfung der Talin-Mutanten

Zur Überprüfung der Sensitivität der Talin-Mutanten für eine proteolytische Spaltung wurden die Plasmide pEYFP-N1+tln Y<sup>436</sup>P, pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>G sowie die Kontrolle pEYFP-N1+tln in HeLa-Zellen transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Die Lysate wurden mittels anti-GFP im Western Blot-Verfahren untersucht. Durch die densitometrische Analyse des jeweiligen Spaltproduktes in Bezug zur ungespaltenen Talin-Bande ließ sich die Effizienz der jeweiligen Spaltung berechnen (Abbildung D.44).



**Abbildung D.44 Überexpression der Talin-Mutanten in HeLa-Zellen.**

HeLa-Zellen wurden mit pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>G (1), pEYFP-N1+tln (2), pEYFP-N1+tln Y<sup>436</sup>P (3) und pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M (4) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, die aufgetrennten Gesamtzelllysate geblottet und anschließend mit anti-GFP inkubiert sowie die relative Talin-Spaltung densitometrisch bestimmt, die bei der Calpainolyse-resistenten Talin-Mutante deutlich reduziert war. Die Hydrolyse von Talin (2) wurde als „100 %“-Referenz genommen.

Im Vergleich zur Kontrolle ist die Bande des durch mCP generierten Talin-Spaltproduktes bei Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP und Talin L<sup>432</sup>G-EYFP nur schwach zu erkennen. Die Überexpression von pEYFP-N1+tln Y<sup>436</sup>P resultierte in einer Erhöhung der Intensität der Bande und deutete somit auf eine vermehrte Proteolyse dieser rekombinanten Talin-Mutante hin.

Bei der Suche nach einer möglichen Erklärung für die unterschiedliche Spaltungseffizienz der Talin-Mutanten durch m-Calpain als Konsequenz der eingebrachten Aminosäureaustausche ließ sich in *in silico*-Ansätzen die Talin head-rod-linker-Sekundärstruktur als möglicher Modulator der Calpain-vermittelten Proteolyse von Talin vorhersagen (Abbildung D.43).

Dieser hoch konservierte Bereich der Talin-Spaltsequenz (Q<sup>433</sup>-Q<sup>434</sup>) bei Talin1 und Talin2 der Vertebraten Maus, Mensch, Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) und des Hühner-Talins (homologe Sequenzen mit PSI-PLAST bestimmt, threshold E = 0,005) scheint für die korrekte Abtrennung des Talin head mit der FERM-Domäne wichtige funktionelle Aufgaben zu übernehmen. Da in der Literatur noch keine Strukturdaten von Talin vorliegen, wurde der COOH-terminale Abschnitt unterhalb der FERM-Domäne des Strukturproteins Moesin analysiert. Dabei überspannt ein langes  $\alpha$ -helikales Struktursegment den Bereich unterhalb der FERM-Domäne, das im Gegensatz zu Talin wenig Sequenzhomologien aufzeigt (Abbildung D.43, blaue Markierung, PDB# 1E5W).

Nun wurden mit den Algorithmen GlobPlot bzw. PSIPred, JPred und PHD Globulär- bzw. Sekundärstrukturvorhersagen für den Talin-Wildtyp und den Calpainolyse-sensitiven (Y<sup>436</sup>P) und -resistenten (L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und L<sup>432</sup>G) Talin-Mutanten getroffen um die Talin head-rod-linker-Sequenz näher zu charakterisieren. Dabei zeigte sich eine auffallende Neigung zur  $\beta$ -Faltblattbildung im Bereich P<sub>4</sub> bis P<sub>4</sub>' der Calpain-Spaltstelle Q<sup>433</sup>-Q<sup>434</sup> der Calpainolyse-sensitiven Talin-Mutante Y<sup>436</sup>P, welche demnach ein wichtiges Strukturmerkmal bei der Calpain-vermittelten Proteolyse darstellen könnte.



Aminosäure	.	410	.	420	.	430	.	440	.	450	.	460	.	470	.	480				
		▼▼▼						▼		▼		▼								
TLN1_MOUSE		KKKKSKDHFGLGDEES		TMLED		SVSPKK		STVLQQQYNRV		GKVEHG		GSVLPAIMRSG		SGSPENFQVGS		MPPAQQQITS		GQMH		
TLN1_HUMAN		KKKKSKDHFGLGDEES		TMLED		SVSPKK		STVLQQQYNRV		GKVEHG		GSVLPAIMRSG		SGSPENFQVGS		MPPAQQQITS		GQMH		
TLN_CHICK		KKKKSKDHFGLGDEES		TMLED		SVSPKK		STVLQQQFN		RVGKAEHG		GSVALPAIMRT		GAGGSPENFQVGT		MPQAQMQITS		GQMH		
TLN1_BRARE		KKKKSKDHFGLGDEES		TMLED		SVSPKK		STVLQQQFN		KMGKVETG		GSVALPAIIR		SGAGGSPES		MKMGSMPQAK		QHITS		GQMH
TLN2_MOUSE		KKKQSKDRFGLGDEES		TMLEE		SVSPKKQ		STILQQQFN		RTGKAHGS		GSVALPVMRSG		SSSGPETFNVG		SMPSPQQQVMV		GQMH		
TLN2_HUMAN		KKKQSKDRFGLGDEES		TMLEE		SVSPKK		STILQQQFN		RTGKAHGS		GSVALPVMRSG		SSSGPETFNVG		SMPSPQQQVMV		GQMH		
TLN2_BRARE		KKKQSKDRFGLGDEEA		TMLEE		SVSPKK		STILQQQFN		RVRVEHG		GSVALPGILR		SGVGAETLNMGT		MPAPQQQITT		GQMH		

MOES\_HUMAN RRRKPDTEIVQQMKAAQAREEKHQKQMER.AMLENEKKKREMAEKEKEKIERekeelmerlkdieeqtkkaqqeleeqtrral  
 pdb|1E5W

#### Talin Wildtyp

PSIpred CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHH.HHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9755544467116764301121000578.88888864784650111100003430688788788545527742023443219  
 JPred CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.HHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 PHD CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.CEECECECC CEEEEECECCCECCCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9986799567889988743565438652.21412303562332323534311122479999764555688644248885329

#### Talin Y436P

PSIpred CCCCCCCCCCCCCCCCCCEHHHCCCCCH.HEEEEEECC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9755544567015865400000146002.11010036874640221101103430688787787545517742023554219  
 JPred CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.CEEEEEECC CCEEECCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 PHD CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.CEEEEEECC CEEEEECECCCECCCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9987798568889978733565518885.43876505780554423545311011579999761235899754027875239

#### Talin L432A/Q435R/N437M

PSIpred CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCCCHH.HHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9756544467015764400111000356.66655532785511102200103440788788888545518742023544219  
 JPred CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.HHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 PHD CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.EEEEEHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 954000243668876641100026750.0331010252110222102202030588776531230115641145531236

#### Talin L432G

PSIpred CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHH.HHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9756544467116764301121000567.78877754675420002200003430788788888545527742023543219  
 JPred CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.CHHHHHHHC CCCCCCECCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 PHD CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCC.CEEEEEECC CEEEEECECCCECECCCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEC  
 Conf.: 9977798567789978725576529864.4253431567244342242421111579999761225899754028987319

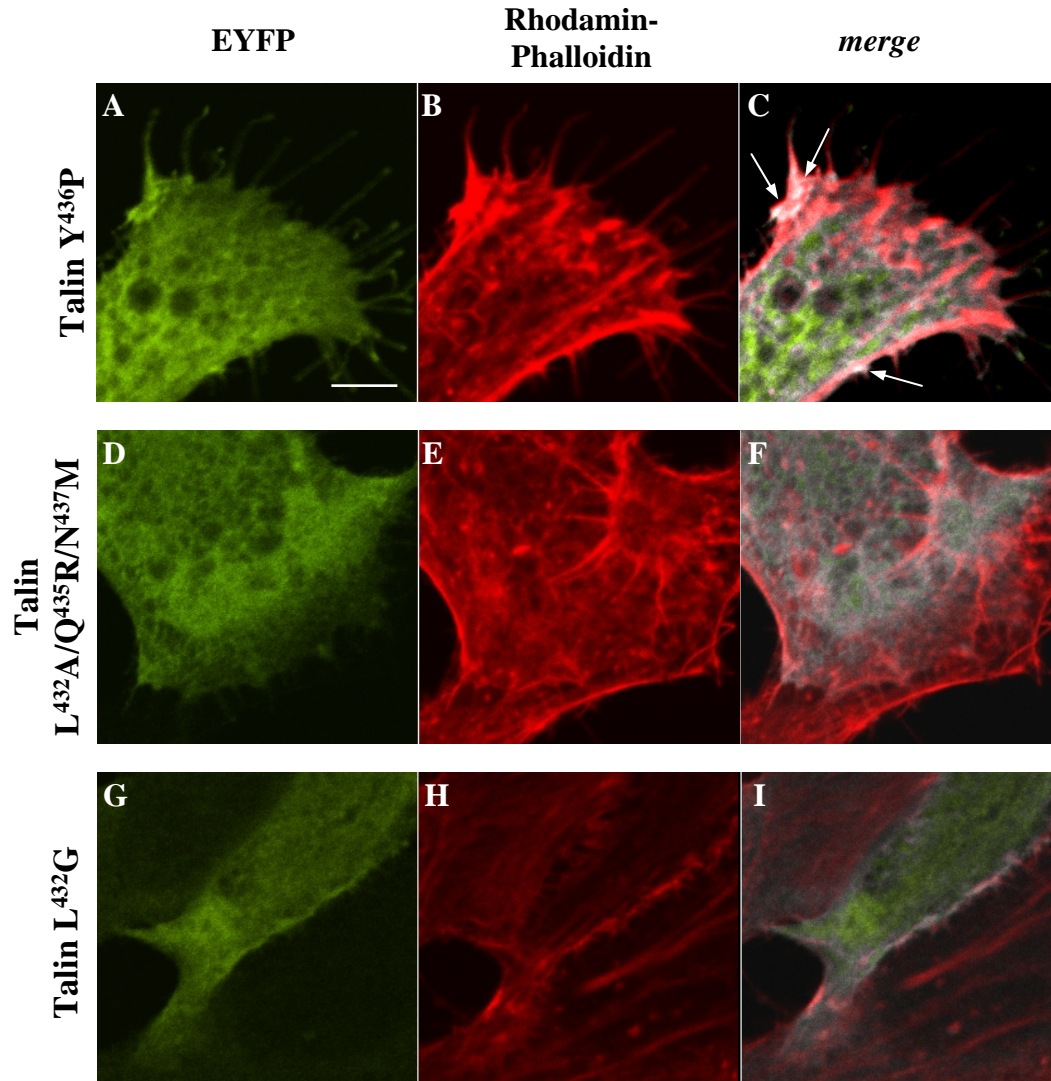
### Abbildung D.43 Sequenzvergleich und Vorhersage der Sekundärstruktur der Talin head-rod-Verbindung sowie der Talin-Mutanten Y<sup>436</sup>P, L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und L<sup>432</sup>G.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur der Calpainolyse-sensitiven (Y<sup>436</sup>P) Talin-Mutante zeigt im Gegensatz zu Calpainolyse-resistenten (L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und L<sup>432</sup>G) Talin-Mutanten eine Neigung zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Die Sicherheit der Vorhersage mit verschiedenen Algorithmen (außer JPred) ist unter der jeweiligen potentiellen Sekundärstruktur angegeben. Dabei entspricht der Wert 9 einer sicheren und 0 einer unwahrscheinlichen Vorhersage. Zusätzlich ist die linker-Struktur von Moesin unterhalb der FERM-Domäne (PDB#1E5W) angegeben.

Blaue Markierung,  $\alpha$ -Helix; H,  $\alpha$ -Helix; E,  $\beta$ -Faltblatt; C, random coil; gelber Pfeil, Calpain-Spaltstelle; schwarzer Pfeil, putative Trypsin-Spaltstelle; blauer Pfeil, putative Thrombin-Spaltstelle; rot unterlegte Buchstaben, gleiche Aminosäuren; grau unterlegte Buchstaben, gruppenähnliche Aminosäuren. Vorhersagen der Sekundärstruktur zwischen P<sub>4</sub> und P<sub>4</sub>' sind mit einem roten Rechteck unterlegt.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation der Talin-Mutanten wurden nun HeLa-Zellen mit pEYFP-N1+*tln* Y<sup>436</sup>P, pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>G transfiziert, nach 48 Stunden mit Rhodamin-markiertem Phalloidin gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie ausgewertet (Abbildung D.45).

Eine Assoziation der Talin-Mutanten mit dem F-Aktin-Netzwerk ist bei der Überlappung (*merge*) der beiden Farbkanäle durch eine weiße Färbung zu erkennen. Während bei der Calpainolyse-sensitiven Talin-Mutation Y<sup>436</sup>P deutlich eine Kolokalisation im *merge*-Kanal zu sehen war, zeigten die resistenten Mutanten Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP und Talin L<sup>432</sup>G-EYFP nur eine geringe oder kaum sichtbare weiße Färbung.



**Abbildung D.45 Kolokalisation von Talin-Mutanten mit dem F-Aktin-Zytoskelett.**

HeLa-Zellen wurden mit pEYFP-N1+*tln* Y<sup>436</sup>P, pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>G transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt.

Eine Kolokalisation der Calpainolyse-sensitiven Talin-Mutante Y<sup>436</sup>P-EYFP mit F-Aktin ist durch die weiße Färbung (weiße Pfeile) zu erkennen.

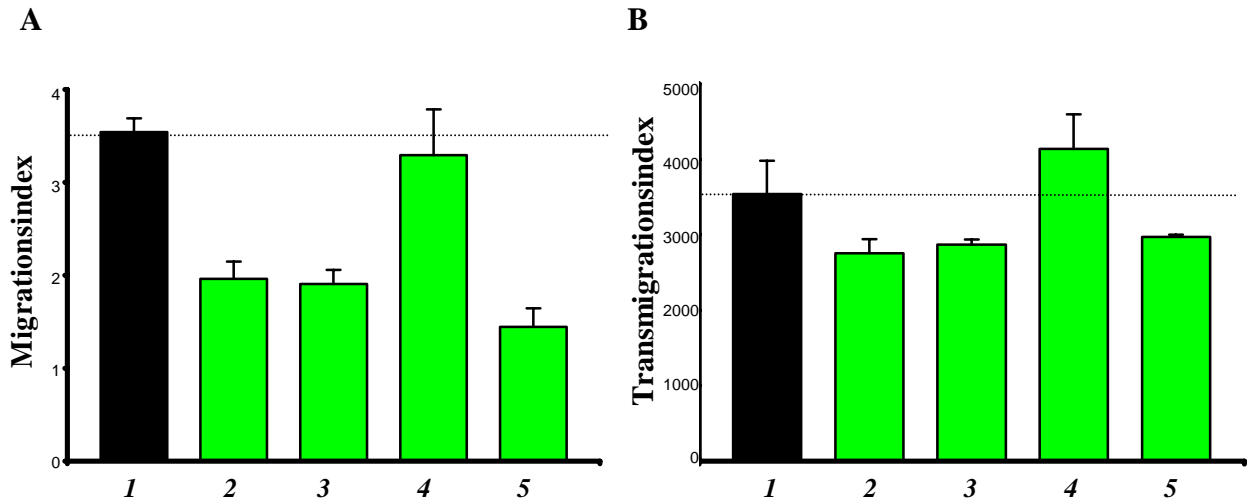
pEYFP-N1+*tln* Y<sup>436</sup>P, EYFP (A), Rhodamin-Phalloidin (B), merge (C); pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M, EYFP (D), Rhodamin-Phalloidin (E), merge (F); pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>G, EYFP (G), Rhodamin-Phalloidin (H), merge (I).

Der Balken entspricht 5 µm.



### D.2.4.2.3 Talin-Mutanten bei der Zellmigration

Der Einfluss der rekombinanten Talin-Mutanten Y<sup>436</sup>P-EYFP, Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP und Talin L<sup>432</sup>G-EYFP auf die Zellmigration und -transmigration wurde 48 Stunden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in *mock*- und *capn2AS*-Zellen mit der in Kapitel C.2.3.12 beschriebenen Methode analysiert. Die Transfektionseffizienz betrug bei allen Varianten zwischen 30 % und 50 %.



**Abbildung D.46 Migration und Transmigration von *capn2AS*-Zellen nach Transfektion mit Talin-Mutanten.** Die Zelllinien *mock* (schwarz) und *capn2AS* (grün) wurden mit pEYFP-N1 (1, 2), pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>G (3), pEYFP-N1+tln Y<sup>436</sup>P (4) und pEYFP-N1+tln L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M (5) transfiziert und anschließend in Migrations- (A) und Transmigrationsexperimenten (B) analysiert. Die Überexpression von Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP (4) bewirkte eine Rekonstitution der Migrations- und Transmigrationskapazität von *capn2AS*.

Wie in Abbildung D.46 dargestellt, zeigte die Überexpression der Calpainolyse-sensitiven Mutante Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP in *capn2AS*-Zellen eine Erhöhung der Migrations- und Transmigrationsfähigkeit bis auf das Niveau von pEYFP-N1-transfizierten *mock*-Zellen und damit eine Wiederherstellung der ansonsten beeinträchtigten Migrationsfähigkeit von *capn2AS*-Zellen. Demgegenüber war bei Transfektion der Calpainolyse-resistenten Mutanten Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP und Talin L<sup>432</sup>G-EYFP in *capn2AS*-Zellen keine signifikante Veränderung der Migrations- und Transmigrationsraten im Vergleich zu pEYFP-N1-transfizierten *capn2AS*-Zellen zu erkennen.

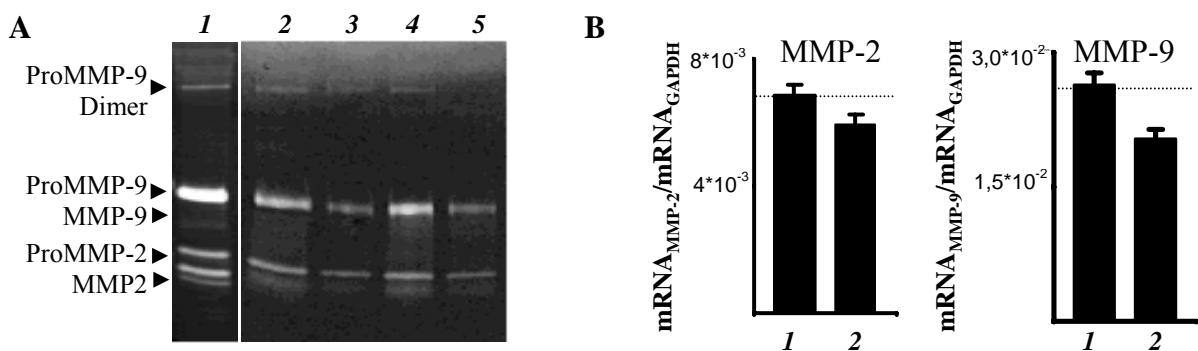
Diese Ergebnisse können als weitere Hinweise darauf gewertet werden, dass Talin als isoformspezifisches Substrat von m-Calpain angesehen werden kann, und dass dessen Spaltung durch mCP eine wesentliche Rolle für eine effiziente Migrationsfähigkeit von Tumorzellen spielt.

### D.3 Beeinflussung von MMP-Regulationsmechanismen durch m-Calpain

Einen weiteren Schwerpunkt der Promotion bildeten schließlich Untersuchungen zum postulierten Einfluss von Calpainen auf Regulationsmechanismen der Expression und Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen. Ausgehend von der Beobachtung, dass bei immortalisierten murinen CP4-KO-Fibroblasten eine Korrelation zwischen Calpain-Aktivität und der mRNA-Expression von MMP-2 nachzuweisen war (POSTOVIT *et al.*, 2002), wurden nun in verschiedenen Tumorzelllinien unter Einsatz von spezifischen Calpain-Inhibitoren einerseits und AS- bzw. RNAi-Strategien andererseits detaillierte Analysen zu potentiell Calpain-isoformabhängigen Regulationsmechanismen der Expression und Freisetzung von MMPs durchgeführt.

#### D.3.1 Verminderte Expression und Freisetzung von MMPs nach Langzeit-Präinkubation von Tumorzelllinien mit spezifischen Calpain-Inhibitoren

In initialen Versuchen zur Klärung einer potentiellen Beteiligung der konventionellen Calpaine bei der MMP-Expression wurden die monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 für 24 Stunden mit dem spezifischen Calpain-Inhibitor CP1B präinkubiert und anschließend die Freisetzung und mRNA-Expression von MMP-2 und -9 untersucht. Dabei wurden die THP-1-Zellen wie in Abschnitt D.1.1.7 beschrieben behandelt und die Überstände aus den Transmigrationsassays mittels Gelatinezymographie analysiert (Abbildung D.47, A). Zur Bestimmung der mRNA-Menge von MMP-2 und MMP-9 wurden die Zellen isoliert und die Transkriptexpression auf das *house keeping*-Gen GAPDH normiert (Abbildung D.47, B).



**Abbildung D.47 Freisetzung und mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 nach Langzeit-Hemmung von Calpain mit dem spezifischen Inhibitor CP1B.**

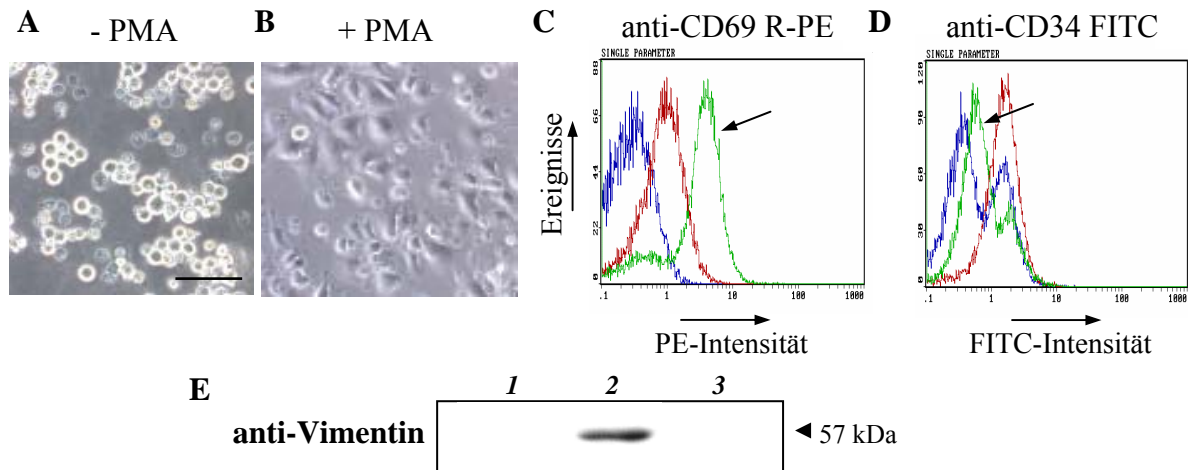
- A** Die THP-1-Zellen wurden entweder mit  $50 \mu\text{M}$  CP1B (3, 5) oder ohne (2, 4) CP1B in serumfreien Medium für 24 Stunden präinkubiert. Anschließend wurden sie wiederum in Gegenwart (4, 5) bzw. in Abwesenheit von CP1B (2, 3) in einem Matrigel-Transmigrationsassay untersucht (siehe Abbildung D.16, A) und die Überstände mit Hilfe der Gelatinezymographie analysiert. Dabei zeigte die Langzeit-Hemmung von Calpainen mit CP1B (3, 5) eine verminderte Freisetzung vor allem von ProMMP-2 und ProMMP-9. 1, Marker
- B** Die mRNA-Expression von MMP-2 und -9 nahm nach 24 Stunden Präinkubation mit CP1B (2) bei THP-1-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1) ab.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte nicht die Zugabe während des Transmigrationsassays, sondern lediglich eine Langzeit-Präinkubation mit dem spezifischen Calpain-Inhibitor CP1B einen Effekt auf die MMP-Freisetzung. Die Hemmung der konventionellen Calpaine konnte die Freisetzung der beiden Gelatinasen MMP-2 und -9, insbesondere der Proformen, vermindern, jedoch nicht vollständig blockieren. Dies verdeutlichte auch die Transkriptexpression von MMP-2 und -9 der für 24 Stunden präinkubierten THP-1-Zellen, wobei nur eine mäßige

Abnahme der MMP-2 mRNA-Expression auf 83 % (Abbildung D.47, B) bzw. der MMP-9 mRNA-Expression auf 72 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gefunden wurde.

Um einen möglichen Einfluss des Differenzierungsgrades von THP-1-Zellen auf die MMP-Freisetzung zu untersuchen, wurden diese mit PMA in Richtung Makrophagen-ähnlichen und mittels DMSO zu Granulozyten-ähnlichen Zellen terminal differenziert. Der Grad der Differenzierung wurde wie in Kapitel C.2.3.5 beschrieben anhand verschiedener Marker überprüft.

Die Stimulation von THP-1-Zellen mit 80 nM PMA in serumfreiem Medium für 24 Stunden resultierte in der Adhäsion der Zellen an die Kulturschale, der Expression der Makrophagen-spezifischen Marker CD69 und Vimentin sowie in der Verminderung von CD34 als Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen (Abbildung D.48).



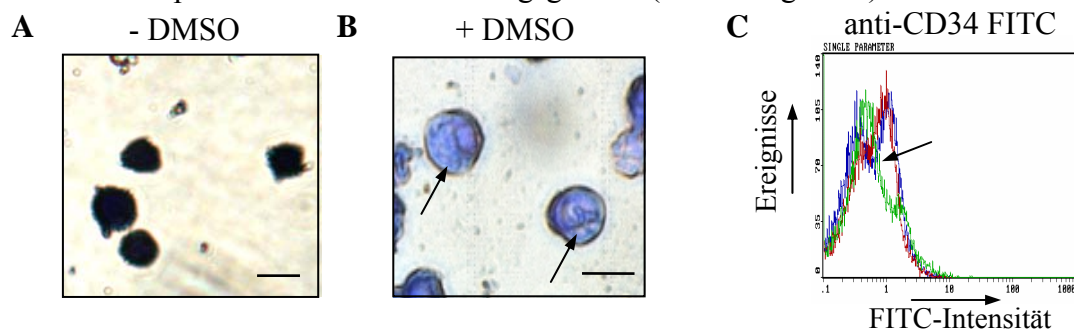
**Abbildung D.48 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen.**

Die terminale Differenzierung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen wurde durch die Inkubation von THP-1-Zellen mit 80 nM PMA erzielt. Dabei zeigten folgende Marker den Grad der Differenzierung an:

Adhäsion von unstimulierten THP-1-Suspensionszellen (A) nach Zugabe von PMA (B); Expression des Makrophagen-spezifischen Markers CD69 (C, blau: Isotypenkontrolle; rot, CD69-PE gefärbte Zellen ohne Differenzierungsreagenz; grün, CD69-PE gefärbte Zellen mit Differenzierungsreagenz, schwarzer Pfeil); Abnahme des hämatopoetischen Vorläuferzellmarkers CD34 (D, Farbkodierung wie bei C, jedoch CD34-FITC, schwarzer Pfeil); Expression von Vimentin (E; 1, 12 Stunden PMA; 2, 24 Stunden PMA; 3, 24 Stunden ohne PMA).

Der Balken bei A entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Nach der Stimulation von THP-1-Zellen mit 1 % (v/v) DMSO in serumfreiem Medium konnte nach 24 Stunden eine Granulozyten-ähnliche Zelldifferenzierung detektiert werden. Dabei zeigten die vermehrte Granularität (Wright-Giemsa-Färbung) und die Abnahme von CD34 den entsprechenden Differenzierungsgrad an (Abbildung D.49).

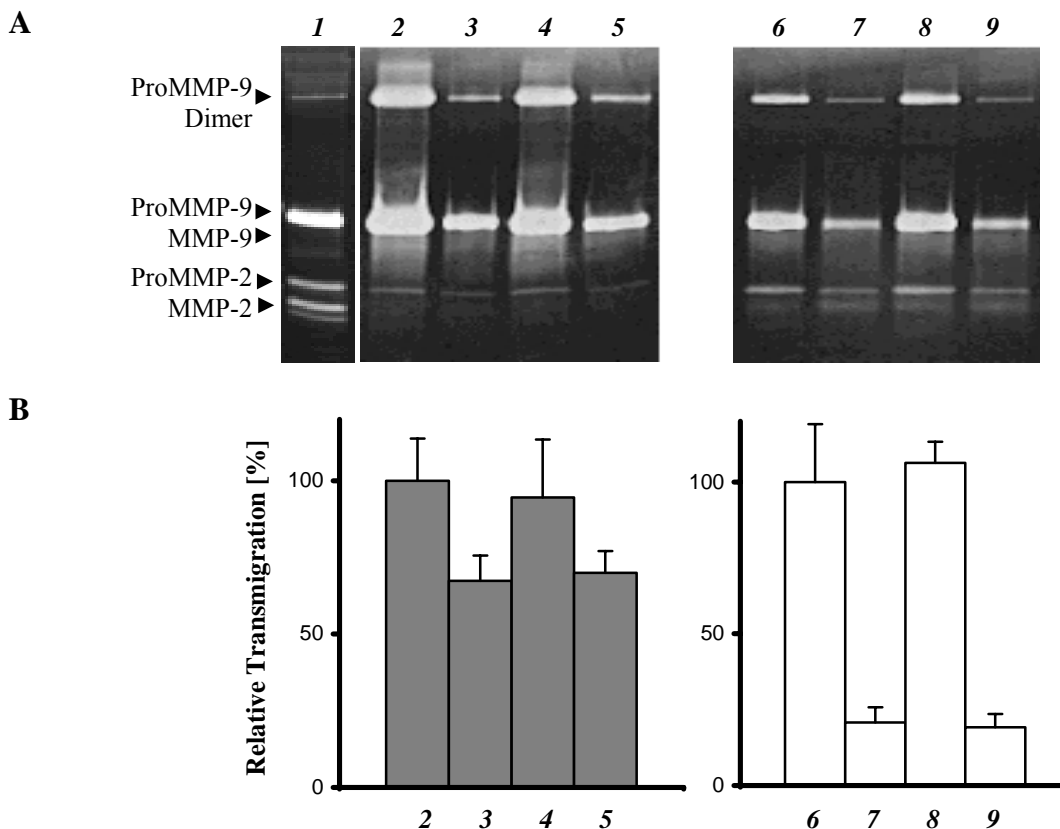


**Abbildung D.49 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Granulozyten-ähnlichen Zellen.**

DMSO-stimulierte Zellen zeigten eine Erhöhung der Granularität (B, schwarze Pfeile) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (A) und eine Abnahme des hämatopoetischen Vorläuferzellmarkers CD34 (B, blau: Isotypenkontrolle; rot, CD34-FITC gefärbte Zellen ohne Differenzierungsreagenz; grün, CD34-FITC gefärbte Zellen mit Differenzierungsreagenz, schwarzer Pfeil).

Der Balken bei A und B entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die terminal differenzierten Zellen wurden nun wie in Kapitel D.1.1.7 dargestellt mit und ohne CP1B-Präinkubation behandelt und in einem Matrigel-Transmigrationsassay hinsichtlich der Invasivität und der Freisetzung von MMP-2 und -9 analysiert (Abbildung D.50). Dabei kam es zwar zu einer generellen Erhöhung der ProMMP-9-Freisetzung durch die Differenzierung mit PMA bzw. DMSO, aber der Effekt der verminderten Freisetzung nach Langzeit-Präinkubation mit CP1B war auch in diesem terminalen Differenzierungsmodell zu erkennen. In Korrelation zur reduzierten Freisetzung vor allem von ProMMP-2- und ProMMP-9 war die Transmigrationsfähigkeit der Zellen nach 24stündiger Calpain-Hemmung durch CP1B im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ebenfalls vermindert. Eine Zugabe des Inhibitors ausschließlich in den Transmigrationsansatz blieb wiederum ohne erkennbare Auswirkungen (Abbildung D.50, A 4, 8 und B 4, 8) auf die Proteinasefreisetzung und die relative Transmigrationsrate der Zellen.



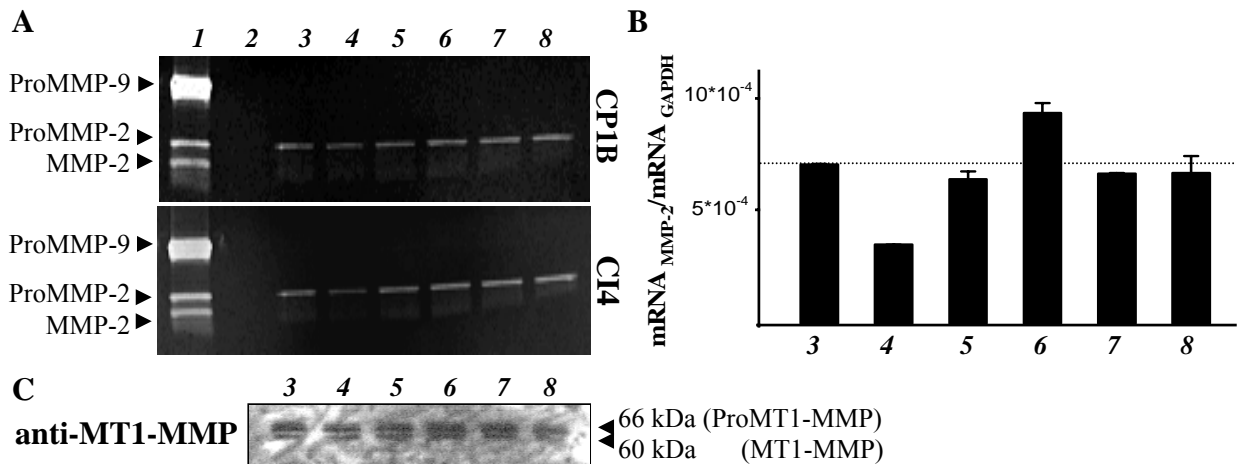
**Abbildung D.50** Verminderte MMP-2- und -9-Freisetzung und Transmigration nach CP1B-Langzeit-Präinkubation von THP-1-Zellen.

THP-1-Zellen wurden mit PMA (2 – 5, graue Balken) oder DMSO (6 – 9, weiße Balken) stimuliert und anschließend hinsichtlich der MMP-2 und -9-Freisetzung (A) sowie der Transmigrationsfähigkeit (B) untersucht. Generell konnte die Langzeit-Präinkubation mit CP1B die Transmigration sowie die MMP-2- und -9-Freisetzung von DMSO- und PMA-stimulierten THP-1-Zellen verringern.

1, Marker; Präinkubation der Zellen mit 50  $\mu$ M CP1B (3, 5, 7, 9) oder ohne (2, 4, 6, 8) Inhibitor in serumfreiem Medium für 24 Stunden; Zellen in Gegenwart (4, 5, 8, 9) oder in Abwesenheit von CP1B (2, 3, 6, 7) während des Matrigel-Transmigrationsassays für weitere 24 Stunden.

Für die Klärung der Frage, ob der potentiell durch Calpain-regulierte Mechanismus der Expression und Freisetzung von MMPs nicht nur differenzierungsunabhängig, sondern auch zelltypenspezifisch sein könnte, wurde als weiteres Modellsystem die epitheliale Adenokarzinoma-Zelllinie HeLa untersucht.

Dafür wurden HeLa-Zellen unter Berücksichtigung der potentiellen Beteiligung der ECM-Protein/Integrin-Interaktion in Vitronektin-beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit 50  $\mu\text{M}$  CP1B oder 180 nM Calpain-Inhibitor 4 (CI4, DUTT *et al.*, 1998) in serumfreiem Medium inkubiert. Nach 1, 3, 6, 9 bzw. 24 Stunden wurden Aliquote der Überstände mittels Gelatinezymographie und die mRNA-Expression der Zellen über RT-PCR untersucht (Abbildung D.51).



**Abbildung D.51 Freisetzung und mRNA-Expression von MMPs nach Langzeit-Präinkubation von HeLa-Zellen mit den spezifischen Calpain-Inhibitoren CP1B und CI4.**

- A** HeLa-Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  CP1B bzw. 180 nM CI4 über verschiedene Zeiträume inkubiert und die Inkubationsüberstände mittels Gelatinezymographie analysiert, wobei jeweils eine zeitabhängige Verminderung der ProMMP-2-Freisetzung beobachtet werden konnte. ProMMP-9 war in keinem Fall nachzuweisen.
- 1, Marker; 2, Medium; 3, 24 Stunden ohne Inhibitor; 4, 24 Stunden mit Inhibitor; 5, 9 Stunden mit Inhibitor; 6, 6 Stunden mit Inhibitor; 7, 3 Stunden mit Inhibitor; 8, 1 Stunden mit Inhibitor.
- B** Aus den Zellen der Versuchsreihe mit CI4 isolierte mRNA wurde nachfolgend mit Hilfe der RT-PCR hinsichtlich der Transkriptexpression von MMP-2 untersucht. Die Werte wurden auf das house keeping-Gen GAPDH normiert.
- Die Spurenbeschriftung entspricht der von A.
- C** Membranlysate von CI4-behandelten Zellen (aus A) wurden im Western Blot-Verfahren hinsichtlich der MT1-MMP-Expression untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede der Expression von Pro- und aktivem MT1-MMP detektiert.
- Die Spurenbeschriftung entspricht der von A.

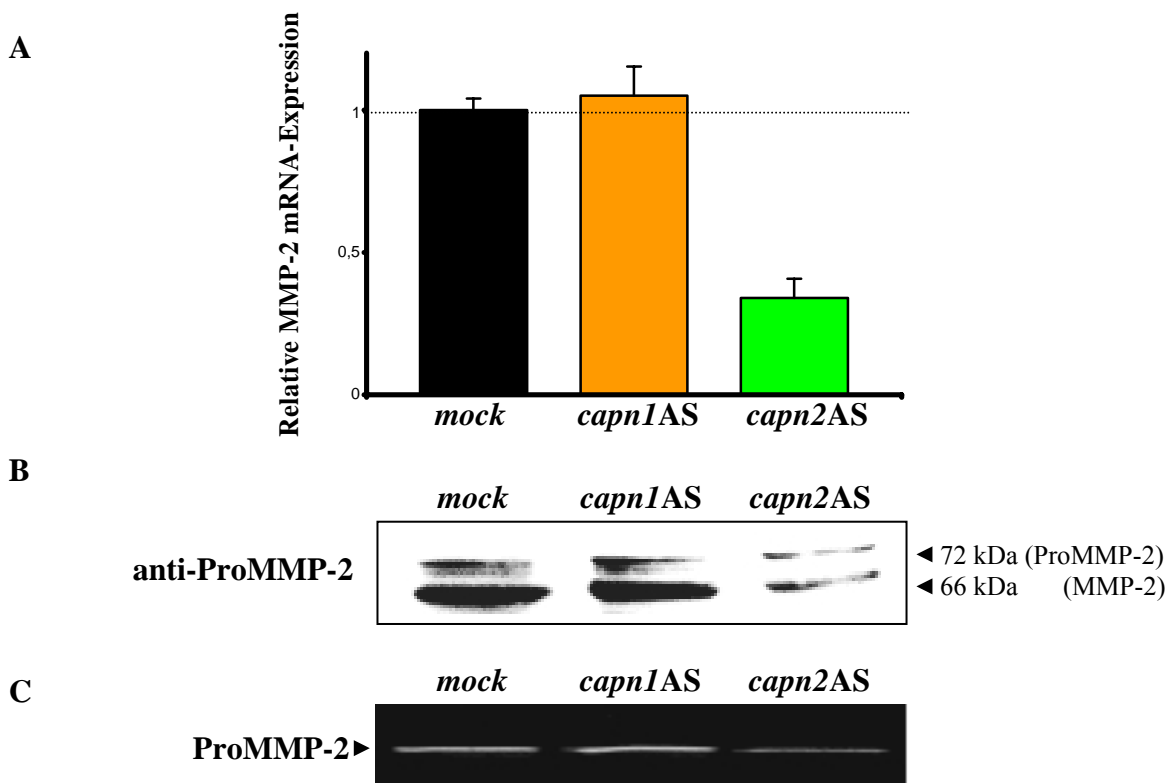
Während unter den Versuchsbedingungen in keinem Fall eine Freisetzung von ProMMP-9 nachzuweisen war, zeigte interessanterweise die Hemmung der Calpaine durch Präinkubation mit CP1B bzw. CI4 eine zeitabhängige Verminderung der ProMMP-2-Freisetzung, wobei jedoch keine absolute Blockierung dieser Freisetzung im Zeitraum von 24 Stunden erzielt werden konnte. Zur Analyse möglicher Ursachen wurde daher die mRNA aus Zellen der Versuchsreihe mit CI4 isoliert und mittels RT-PCR die Transkriptexpression von MMP-2 in Bezug zum house keeping-Gen GAPDH untersucht. Auch hier konnte eine zeitabhängige Verringerung der MMP-2 mRNA beobachtet werden, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf 51 % bei 24ständiger Inkubation mit CI4 reduziert war.

Um eine mögliche Beeinflussung der Expression auch anderer MMPs durch die Langzeit-Präinkubation von HeLa-Zellen mit CP1B zu untersuchen, wurde exemplarisch die Expression von MT1-MMP im Western Blot-Verfahren analysiert. Durch die Calpain-Hemmung konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression der Pro- oder aktiven Form von MT1-MMP detektiert werden (Abbildung D.51, C). Daher wurde ein Einfluss auf die Expression von MT1-MMP durch die Hemmung von Calpain bei HeLa-Zellen im Gegensatz zu MMP-2 weitgehend ausgeschlossen.

### D.3.2 Verringerte Zellmembran-Lokalisierung und Freisetzung von MMP-2 bei CP2-supprimierten HeLa-Zellen

Um nun näher die Beteiligung der einzelnen Calpain-Isoformen bei der mRNA-Expression und Freisetzung von MMP-2 zu analysieren, wurden Zelllysate und Transmigrationsüberstände von *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle sowie von *nsRNAi*-, *capn1RNAi*-, *capn2RNAi*-, *capn4RNAi*-, *capn1/capn4RNAi*- und *capn2/capn4RNAi*-Zellen hinsichtlich der Transkriptexpression bzw. potentiellen gelatinolytischen Aktivität untersucht.

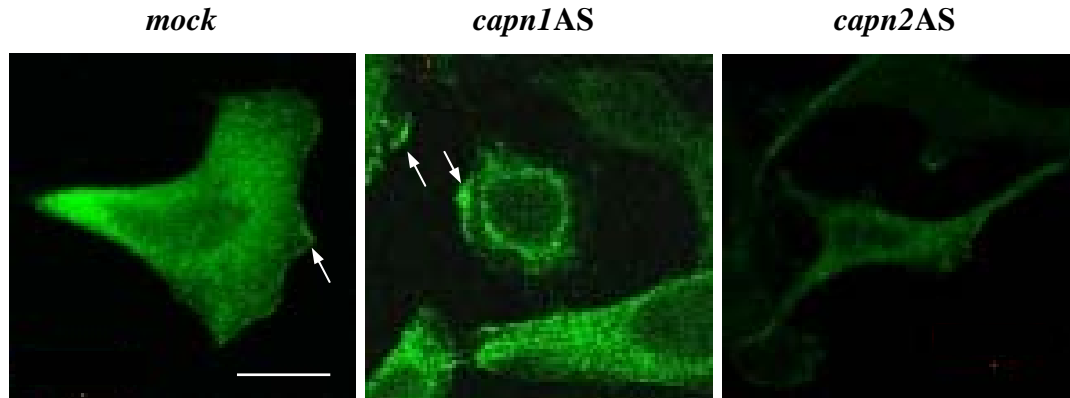
Wie in Abbildung D.52, A dargestellt, zeigte die quantitative Analyse des MMP-2-Transkriptniveaus eine signifikante Verminderung bei *capn2AS*-Zellen ( $34 \% \pm 6,8 \%$ ) im Vergleich zur *mock*-Kontrolle ( $100 \% \pm 4,0 \%$ ) und *capn1AS*-Zellen ( $105 \% \pm 10,3 \%$ ). Zur Klärung einer möglichen Korrelation zwischen Transkriptexpression und der Bildung bzw. Freisetzung von MMP-2 wurden Membranlysate im Western Blot-Verfahren (Abbildung D.52, B) und Transmigrationsüberstände mittels Gelatinezymographie (Abbildung D.52, C) analysiert. In Analogie zur reduzierten mRNA-Expression von MMP-2 bei *capn2AS*-Zellen wurde eine deutlich verringerte Membranassoziation der Pro- und aktiven Form von MMP-2 sowie der potentiellen gelatinolytischen Aktivität detektiert, während *capn1AS*-Zellen keine Unterschiede zur *mock*-Kontrolle aufzeigten.



**Abbildung D.52 Expression, Lokalisation und Freisetzung von MMP-2 bei mock- und AS-Zellen.**

Die MMP-2 mRNA-Expression war bei *capn2AS*-Zellen (grün) im Gegensatz zur *mock*-Kontrolle (schwarz) und *capn1AS*-Zellen (orange) deutlich verringert (A). Das Membranlysate von *capn2AS*-Zellen zeigte im Western Blot-Verfahren ebenfalls eine deutliche Calpain-isoformspezifische Verminderung der Pro- und aktiven Form von MMP-2 bei *capn2AS*-Zellen (B). Eine Analyse der Überstände eines Matrigel-Transmigrationsassays mittels Gelatinezymographie wies ebenfalls eine reduzierte potentielle gelatinolytische Aktivität von ProMMP-2 bei *capn2AS*-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle und *capn1AS*-Zellen (C) auf.

Die ProMMP-2-Verminderung in den Membranlysaten der *capn2AS*-Zellen konnte auch durch immunzytologische Färbungen bestätigt werden. Während (Pro)MMP-2 bei *mock* und *capn1AS* an Membranstrukturen der Zellgrenze akkumuliert auftrat, ließen sich *capn2AS*-Zellen generell mit dem Antikörper gegen (Pro)MMP-2 nur schwach färben (Abbildung D.53).

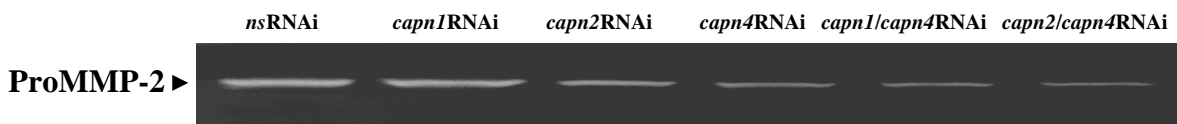


**Abbildung D.53 Membranlokalisierung von (Pro)MMP-2 bei mock- und AS-Zellen.**

*Mock-, capn1AS- und capn2AS-Zellen wurden mit anti-ProMMP-2 und dem entsprechenden fluorogenen Konjugat gefärbt, wobei eine deutliche Verringerung von (Pro)MMP-2 bei capn2AS-Zellen beobachtet werden konnte. Deutlich ist die Akkumulation von (Pro)MMP-2 bei der mock-Kontrolle und bei capn1AS-Zellen an der membrannahen Zellperipherie zu erkennen (weiße Pfeile).*

*Der Balken entspricht 10 µm.*

Für die Bestätigung der Ergebnisse, die mit den AS-Zelllinien hinsichtlich der Calpain-isoformspezifischen MMP-2-Regulation erhalten wurden, sowie für eine detaillierte Analyse hinsichtlich der Interaktion der Calpain-Untereinheiten wurden *nsRNAi*-, *capn1RNAi*-, *capn2RNAi*-, *capn4RNAi*-, *capn1/capn4RNAi*- und *capn2/capn4RNAi*-HeLa-Zellen 5 Tage nach der Transfektion der jeweiligen Plasmide in einem Matrigel-Transmigrationsassay untersucht (siehe Kapitel D.1.1.7). Parallel dazu wurden die Überstände in einer Gelatinezymographie hinsichtlich der MMP-2-Freisetzung analysiert (Abbildung D.54). Wie bei *capn2AS*-Zellen wurde durch die Expression der siRNA gegen *capn2* auch die Freisetzung von (Pro)MMP-2 vermindert. Interessanterweise zeigte die Suppression von *capn4* alleine und in Kombination mit den großen Untereinheiten, insbesondere von *capn2*, eine deutliche Verringerung der potentiellen gelatinolytischen Aktivität von ProMMP2.



**Abbildung D.54 Verminderte MMP-2-Freisetzung durch RNAi-induzierte Suppression von capn2 und capn4.**

*HeLa-Zellen wurden mit pRNAi\_ns, pRNAi\_capn1, pRNAi\_capn2, pRNAi\_capn4 sowie mit den Kombinationen pRNAi\_capn1/capn4 und pRNAi\_capn2/capn4 transfiziert und nach 5 Tagen in einem Matrigel-Transmigrationsassay eingesetzt. Der Überstand wurde mittels Gelatinezymographie analysiert. Dabei wurde eine Verringerung der potentiellen gelatinolytischen Aktivität der Überstände von capn2RNAi, capn4RNAi, capn1/capn4RNAi und vor allem von capn2/capn4RNAi detektiert.*

### D.3.3 Kolokalisierung von Talin-Varianten/-Mutanten mit (Pro)MMP-2 in *capn2AS*-Zellen

Für die Mechanismen der invasiven Migration sind zwei Prozesse von grundlegender Bedeutung: (1) die Adhäsion der Zelle an die ECM und (2) deren proteolytische Degradation. Dabei spielen sowohl Integrine als auch MMPs zentrale Rollen. So deuten mehrere Daten auf eine Assoziation von MMP-2 mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  während der zellulären Migration hin (DERYUGINA *et al.*, 2001; BROOKS *et al.*, 1996), wobei diese Protein-Protein-Interaktion mit der Aktivierung von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in Verbindung gebracht wurde (DERYUGINA *et al.*, 2000; BOGNER *et al.*, 2000).

Bei unseren Untersuchungen zu potentiell Calpain-isoformspezifisch regulierten Mechanismen der Expression und Freisetzung von MMP-2 sollte nun noch eine mögliche Interaktion zwischen dem Integrin-assoziierten Talin und der Expression von (Pro)MMP-2 auf zellulärer Ebene mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie überprüft werden.

Hierfür wurden zur Gewährleistung der Integrin-Beteiligung *capn2AS*-Zellen auf Vitronektin-beschichtete Glasobjektträger ausgesät und mit den Talin-Konstrukten pEYFP-N1+*tln*, pEYFP-N1+*tln rod*, pEYFP-N1+*tln head*, pEYFP-N1+*tln* Y<sup>436</sup>P, pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>G und pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M sowie der Kontrolle pEYFP-N1 transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-(Pro)MMP-2 und Rhodamin-Phalloidin, wie in Kapitel C.2.3.9.1 beschrieben, gefärbt.

Die Auswertung der EYFP-Markierung mittels der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie zeigte ausschließlich bei Talin *head* und Talin Y<sup>436</sup>P eine deutliche Kolokalisierung der beiden Talin-Konstrukte mit (Pro)MMP-2 (Alexa633), während die verkürzte Talin-Variante Talin *rod* sowie die Calpainolyse-resistenten Talin-Mutanten L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M und L<sup>432</sup>G keine Assoziation der jeweiligen exprimierten Talin-Formen mit (Pro)MMP-2 aufwiesen. Die Kolokalisierung ist durch die weiße Färbung an den F-Aktin-reichen Membranstrukturen klar zu erkennen (Abbildung D.55).

Die Überexpression der beiden Talin-Konstrukte Talin *head*-EYFP und Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP in der CP2-defizienten HeLa-Zelllinie *capn2AS* konnte eine verminderte (Pro)MMP-2-Membranlokalisierung (siehe Abbildung D.53) wieder normalisieren (Abbildung D.55, H bzw. AB). Nach diesen Ergebnissen scheint der Bildung des Talin *head*-Spaltproduktes eine wichtige Aufgabe bei Regulationsmechanismen von MMP-2 zuzukommen. Daran möglicherweise beteiligte Faktoren der Signaltransduktion wurden daher näher untersucht und sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

---

#### Abbildung D.55 Kolokalisierung von Talin *head* und Talin Y<sup>436</sup>P mit (Pro)MMP-2 in *capn2AS*-Zellen.

Die AS-Zelllinie *capn2AS* wurde auf Vitronektin-beschichtete Glasobjektträger ausgesät und nach 24 Stunden mit den Plasmiden pEYFP-N1 (A, B, C, D), pEYFP-N1+*tln* Y<sup>436</sup>P (E, F, G, H), pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M (I, J, K, K), pEYFP-N1+*tln* L<sup>432</sup>G (M, N, O, P), pEYFP-N1+*tln* (Q, R, S, T), pEYFP-N1+*tln rod* (U, V, W, X) und pEYFP-N1+*tln head* (Y, Z, AA, AB) transfiziert. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Antikörper anti-(Pro)MMP-2 (Konjugat anti-mouse Alexa 633) und Rhodamin-Phalloidin gefärbt sowie die Fluoreszenzen von EYFP (A, E, I, M, Q, U, Y), Rhodamin (B, F, J, N, R, V, Z), Alexa633 (C, G, K, O, S, W, AA) und der Überlagerungskanal (merge, D, H, K, P, T, X, AB) bildlich dargestellt. Die Kolokalisierung von EYFP und Alexa633 ist durch die weiße Färbung zu erkennen. Deutlich ist im merge-Kanal die Kolokalisation von Talin *head*-EYFP (H) und der Calpainolyse-sensitiven Talin-Mutante Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP (AB) mit (Pro)MMP-2 an F-Aktin-reichen membrannahen Strukturen zu erkennen (weiße Pfeile).

Der Balken entspricht 5  $\mu$ m.

(Abbildung auf der folgenden Seite!)



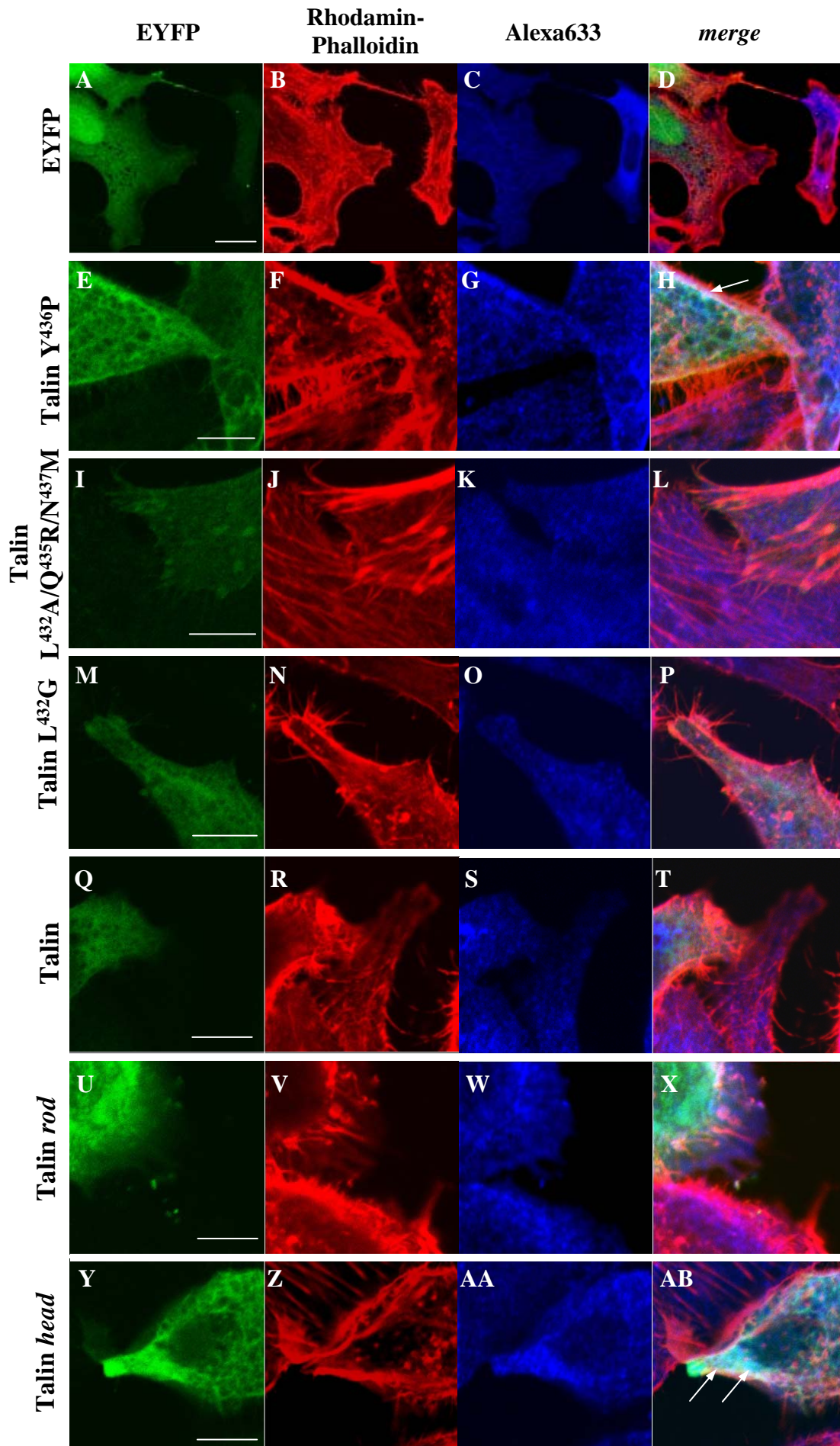


Abbildung D.55 (Bildlegende auf der vorherigen Seite)

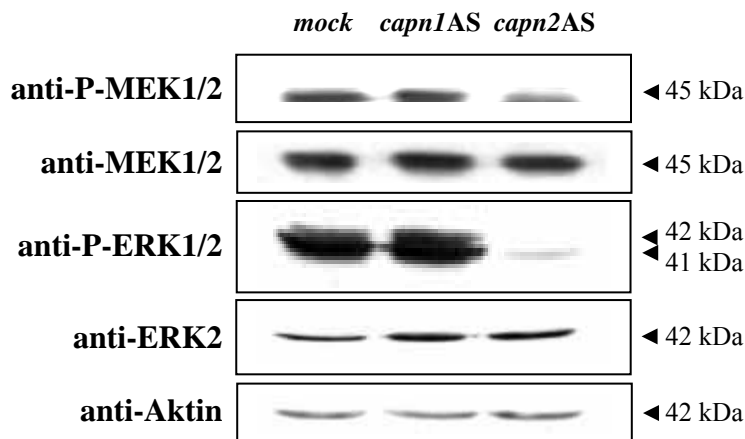
### D.3.4 Beeinträchtigung intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen bei der m-Calpain-abhängigen Regulation von MMP-2

Nachdem unsere bisherigen Untersuchungsergebnisse deutlich den postulierten Calpain-isoformspezifischen Einfluss auf diverse Schritte der MMP-Regulation gezeigt haben, sollte schließlich noch eine detailliertere Aufklärung von zugrunde liegenden intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen erfolgen. Aufgrund von Literaturhinweisen zur intrazellulären Regulation der MMP-Expression haben wir uns primär dem ERK/MAPK-Signalweg zugewandt.

#### D.3.4.1 Unterbrechung des ERK/MAPK-Signalweges bei *capn2AS*

Die Regulierung von MMPs durch den ERK/MAPK-Signaltransduktionsweg wird zur Zeit intensiv diskutiert (STERNLICHT & WERB, 2001). Infolgedessen wurden nun auch von uns MEK1/2 und die regulierte multivalente Effektorkinase ERK1/2 hinsichtlich ihrer Expression und Aktivität (anhand der phosphorylierten Formen) mittels Western Blot-Analysen von Vitronektin-stimulierten Calpain-AS-Zellen untersucht (Abbildung D.56).

Hierdurch konnte eine Beeinträchtigung der ERK/MAPK-Signalübertragung bei *capn2AS*-Zellen festgestellt werden, da die phosphorylierten Formen von ERK1/2 und MEK1/2 im Gegensatz zur *mock*-Kontrolle und *capn1AS*-Zellen verringert waren. Die Regulierung scheint demnach bereits oberhalb dieser beiden Kinasen gestört zu sein. Diese Beeinträchtigung der MEK1/2 → ERK1/2-Signaltransduktion korreliert deutlich mit der verminderten MMP-2-Expression in *capn2AS*-Zellen (siehe Abbildung D.52)

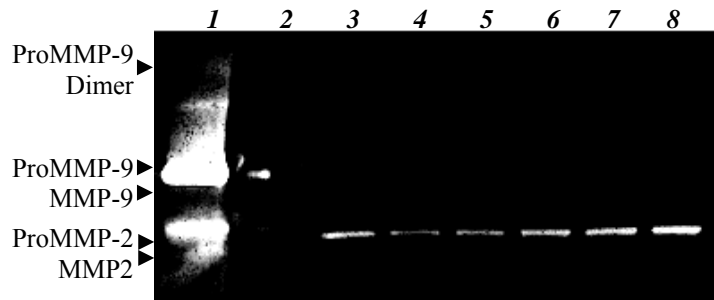


**Abbildung D.56 Unterbrechung des ERK/MAPK-Signalweges bei *capn2AS*-Zellen.**

Gesamtzelllysate von *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurden im Western Blot-Verfahren mit anti-ERK2, anti-P-ERK1/2, anti-MEK1/2, anti-P-MEK1/2 und anti-Aktin analysiert. Anhand der verminderten phosphorylierten Formen P-MEK1/2 und P-ERK1/2 konnte eine Beeinträchtigung der ERK/MAPK-Signalübertragung bei *capn2AS*-Zellen detektiert werden.

Zur weiteren Klärung einer potentiellen Relevanz der MEK1/2 → ERK1/2-Signaltransduktion für die MMP-2-Freisetzung (Expression) in unserem Zellsystem wurden nicht-transfizierte HeLa-Zellen mit 25 µM des spezifischen MEK-Inhibitors PD98059 über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und die Zellkulturüberstände mittels Gelatinezymographie analysiert (Abbildung D.57).

Eindeutig konnte eine zeitabhängige Verminderung der potentiellen gelatinolytischen Aktivität von ProMMP-2 nachgewiesen werden. Bemerkenswert war in diesem Versuchsansatz, dass die detektierte Menge an ProMMP-2 bereits nach 9 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor abnahm, während bei der Hemmung der Calpaine mit CP1B und CI4 erst nach 24 Stunden eine deutlich verringerte ProMMP-2-Expression und -Freisetzung gefunden wurde (siehe Abbildung D.51). Betrachtet man diese beiden Ergebnisse gemeinsam, so könnten Calpaine oberhalb der MEK1/2 → ERK1/2-Signaltransduktionskaskade eingreifen. In den weiteren Versuchen wurden deshalb mögliche Regulationsfaktoren oberhalb dieser Signalkaskade untersucht.



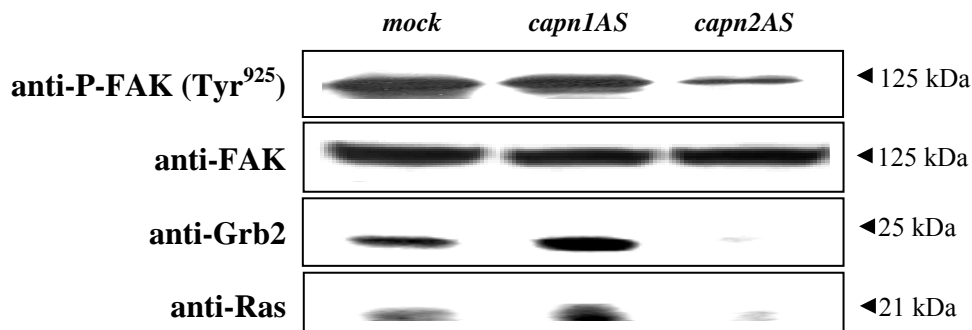
**Abbildung D.57 ProMMP-2-Freisetzung bei HeLa-Zellen durch Hemmung von MEK1/2 mit PD98059.**

HeLa-Zellen wurden mit 25  $\mu$ M PD98059 für 1 Stunde (8), 3 Stunden (7), 6 Stunden (6), 9 Stunden (5), 24 Stunden (4) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne den Inhibitor für 24 Stunden kultiviert (3). Deutlich konnte durch PD98059 eine zeitabhängige Verminderung der potentiellen gelatinolytischen Aktivität von ProMMP-2 detektiert werden.

1, Marker; 2, Medium.

#### D.3.4.2 Beeinträchtigung der Rekrutierung von Grb2 und Ras an die Zellmembran bei *capn2AS*

Neben der Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges durch Wachstumsfaktoren können auch Integrin-vermittelte Stimulationen die ERK-Phosphorylierungskaskade auslösen (RENSHAW *et al.*, 1999). Ein wichtiger Verknüpfungspunkt ist dabei das Adaptorprotein Grb2, das nach erfolgter Integrin-Aktivierung FAK binden kann und schließlich über SOS, ein Ras-GEF, die Ras/Raf/ERK/MAPK-Signaltransduktion induziert. Zur eingehenden Analyse dieses Signalweges wurden *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen auf Vitronectin beschichtete Zellkulturplatten zur Sicherstellung der Integrin-Beteiligung ausgesät, fraktioniert lysiert und die Membranlysate mittels Western Blot-Analyse untersucht.



**Abbildung D.58 Vitronectin-stimulierte Membranlokalisierung von Grb2, Ras und phosphoryliertem FAK (Tyr<sup>925</sup>) bei *mock*- und *AS*-Zellen.**

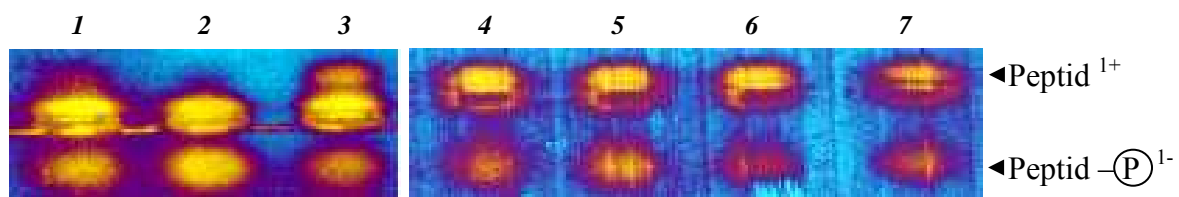
Membranlysate von *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen wurden mit den Antikörpern gegen Grb2, Ras und P-FAK (Tyr<sup>925</sup>) getestet. Dabei zeigte sich bei den Vitronectin-stimulierten *capn2AS*-Zellen eine deutliche Verringerung der Grb2- und Ras-Lokalisierung an der Zellmembran sowie eine verminderte FAK (Tyr<sup>925</sup>) Phosphorylierung.

Wie in Abbildung D.58 dargestellt, korrelierte eine Vitronectin-abhängige verminderte Phosphorylierung von FAK an Tyr<sup>925</sup> (wichtig für die Bildung der SH2-SH3-Bindungsstelle, siehe Abschnitt B.2.1.2) mit einer verminderten Proteinmenge von Grb2 und Ras an der Zellmembran bei *capn2AS*-Zellen, während bei der *mock*-Kontrolle und *capn1AS*-Zellen keine Reduktion der Faktoren festgestellt wurde. Diese potentiell durch eine verringerte Aktivierung (Phosphorylierung) von FAK beeinträchtigte Rekrutierung des Bindungsproteins Grb2 und der GTPase Ras an die Zellmembran zeigt eine deutliche Beziehung zur verminderten Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 (siehe Abbildung D.56) sowie zur reduzierten MMP-2-Expression bei *capn2AS*-Zellen (siehe Abbildung D.52).

#### D.3.4.3 Verminderte PKC $\alpha$ / $\beta$ II-Aktivität bei *capn2AS*

Bei der Regulation der Expression und Freisetzung von MMPs über den ERK/MAPK- Signaltransduktionsweg wurde auch die Beteiligung von PKC in einer Studie von Genersch *et al.* diskutiert (GENERSCH *et al.*, 2000). Infolgedessen haben wir Lysate von *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen sowie von mit pRNAi\_ *ns*, pRNAi\_ *capn1*, pRNAi\_ *capn2* und pRNAi\_ *capn4* transfizierten HeLa-Zellen in einem *pan* PKC-Aktivitätstest entsprechend Kapitel C.2.4.7 analysiert (Abbildung D.59).

Die *down*-Regulation von Calpain-Isoformen führte bei *capn1* (Abbildung D.59, 2, 5) zu einer erhöhten bzw. bei *capn2* und *capn4* (Abbildung D.59, 3, 6 und 7) zu einer verminderten *pan* PKC-Aktivität.

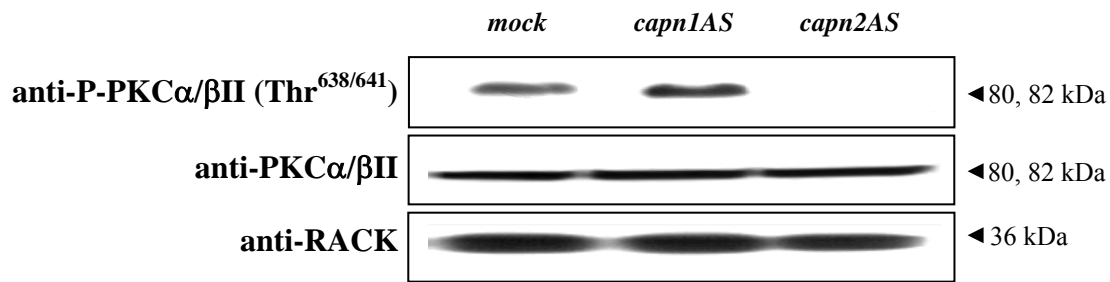


**Abbildung D.59 Pan PKC-Aktivität bei Calpain-AS- und RNAi-Zellen sowie entsprechenden Kontrollzellen.**

Gesamtzelllysate von *mock*- (1), *capn1AS*- (2), *capn2AS*-Zellen (3) und mit pRNAi\_ *ns* (4), pRNAi\_ *capn1* (5), pRNAi\_ *capn2* (6) sowie mit pRNAi\_ *capn4* (7) transfizierten HeLa-Zellen wurden hinsichtlich der Fähigkeit zur Phosphorylierung eines spezifischen PKC-Substrates, wie in Abschnitt C.2.4.7 erläutert, untersucht. Die *down*-Regulation von *capn2* und *capn4* war mit einer deutlichen Verminderung der *pan* PKC-Aktivität assoziiert.

Zur Identifizierung potentieller PKC-Isoformen, die für die erhöhte bzw. verringerte *pan* PKC-Aktivität verantwortlich sein könnten, wurden die Lysate von Vitronectin-stimulierten *mock*-, *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen mittels Western Blot-Analysen hinsichtlich der Expression einzelner PKC-Isoformen untersucht. Die Membranfraktionen wurden hierfür mit Antikörpern gegen P-PKC $\alpha$ / $\beta$ II, PKC $\alpha$ / $\beta$ II und dem endogenen Rezeptor RACK für aktivierte C-Kinasen als Kontrolle inkubiert.

Wie in Abbildung D.60 dargestellt, trat eine Vitronectin-abhängige Hemmung der PKC $\alpha$ / $\beta$ II-Autophosphorylierung von Thr<sup>638/641</sup> bei *capn2AS*-Zellen auf, während bei *capn1AS*-Zellen eine Erhöhung im Vergleich zur *mock*-Kontrolle zu sehen war. Der endogene Rezeptor RACK zeigte keine Unterschiede in den Calpain-AS-Zellen und der *mock*-Kontrolle.



**Abbildung D.60 PKC-Isoformen bei Vitronektin-stimulierten mock- und Calpain-AS-Zellen.**

Gesamtzelllysate von mock-, capn1AS- und capn2AS-Zellen wurden mit Antikörpern gegen P-PKCα/βII, PKCα/βII und RACK getestet. Dabei zeigte sich bei Vitronektin-stimulierten capn2AS-Zellen keine PKCα/βII Autophosphorylierung im Vergleich zur mock-Kontrolle, während die Phosphorylierung bei capn1AS-Zellen gegenüber der mock-Kontrolle erhöht war.

Fasst man die Ergebnisse einer über Vitronektin/Integrin-Interaktionen vermittelten Beteiligung der ERK/MAPK-Signalkaskade bei der MMP-2-Expression zusammen, so zeigte sich insbesondere eine verminderte Aktivität von MEK1/2 und der Effektorkinase ERK1/2 bei capn2AS-Zellen in Korrelation zur erniedrigten MMP-2-Expression. Diese Beeinträchtigung des Signalweges war mit der reduzierten Bildung des FAK/Grb2/Ras-Signalkomplexes an der Zellmembran bzw. mit einer verminderten Aktivität von PKCα/βII assoziiert. Welche möglichen Interaktionen diesen Signaltransduktionsfaktoren mit anderen Regulationsmechanismen bei der potentiell m-Calpain-vermittelten MMP-2-Expression zukommen könnten, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

## E Diskussion

Obwohl die konventionellen Calpaine mit einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in Verbindung gebracht werden, ist ihr Einfluss auf die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen nur unvollständig aufgeklärt. Die bisher beschriebene Beteiligung der konventionellen Calpaine an der Zellmigration (DEDIEU *et al.*, 2004; POPP *et al.*, 2003; KASSIS *et al.*, 2002), der Apoptose (MOMENI & KANJE, 2005; DANIAL & KORSMEYER, 2004; GIL-PARRADO *et al.*, 2002) und der Zellzyklusprogression (CHEN *et al.*, 2001; MELLGREN, 1997; ZHANG *et al.*, 1997) beruht hauptsächlich auf Beobachtungen in Verbindung mit der Anwendung von spezifischen Calpain-Inhibitoren. Da jedoch diese Calpain-Inhibitoren nicht in der Lage sind, selektiv  $\mu$ CP oder mCP zu hemmen (GOLL *et al.*, 2003), ist die Rolle der jeweiligen Isoform bei den oben genannten Prozessen ebenfalls kaum bekannt. Deshalb war die Etablierung diverser Strategien zur isoformspezifischen Regulierung der Calpain-Expression und die anschließende Aufklärung der Auswirkungen auf die Tumorzellmigration neben anderen zellulären Funktionen eine der Hauptaufgaben der vorliegenden Arbeit. In den folgenden Kapiteln sollen nun die erzielten Ergebnisse im Kontext mit bereits beschriebenen Daten diskutiert werden.

### E.1 Isoformspezifische *down*-Regulierung konventioneller Calpaine und ihre Auswirkung auf die Expression diverser Genprodukte

Für die Analyse von spezifischen Genprodukten innerhalb von Zellen werden eine Reihe von endogenen Mechanismen ausgenutzt, die es erlauben, gezielt einzelne Gene und deren Produkte auszuschalten, um den dabei entstehenden Phänotyp zu charakterisieren. Neben dem Eingriff auf mRNA-Ebene mittels AS-Konstrukten (CANTER *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2005), RNAi (SUGA *et al.*, 2005; ELBASHIR *et al.*, 2001) und *hammerhead* Ribozymen (GRASSI *et al.*, 2005; WADHWA *et al.*, 2004) kann die Existenz und somit die Aktivität eines jeweiligen Genprodukts auch auf Proteinebene beeinflusst werden, wie etwa durch die Überexpression von Negativmutanten (KWEI *et al.*, 2005; MIAO *et al.*, 2005) und CALI (*chromophore-assisted laser inactivation*) (EUSTACE & JAY, 2005; TANABE *et al.*, 2005).

Zur Untersuchung der Beteiligung der beiden Calpain-Isoformen  $\mu$ CP und mCP – getrennt und in Kombination miteinander – an der Migration und anderen Funktionen von Tumorzellen wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit zwei Strategien für die *down*-Regulierung der Calpain-Expression verwendet: (1) stabile AS-Klone, und (2) transiente Induzierung von RNAi.

Mit den bereits in der Abteilung generierten jeweils acht CP1- und CP2-AS-Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie *mock* (TANNENBERG, 2000) standen zunächst schon wichtige Zellmodelle für die geplanten Untersuchungen diverser Eigenschaften von Tumorzellen zu unserer Verfügung. Aus diesen Zelllinien wurden nun diejenigen mit der geringsten Expression von *capn1* und *capn2* ausgewählt. Die beiden AS-Zelllinien zeigten im Vergleich zur *mock*-Kontrolle eine jeweils isoformspezifische Reduzierung der Calpain-Expression und Aktivität (siehe Abbildung D.1 und D.2). Da die endogene Calpain-Aktivität im Ruhezustand allgemein sehr gering ist, und die meisten Calpain-Moleküle mit dem endogenen Inhibitor Calpastatin assoziiert sind (GOLL *et al.*, 2003), wurde zum besseren Nachweis und zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierbaren Aktivität der Calpaine das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin verwendet (GIL-PARRADO *et al.*, 2002, LIU & HERMANN, 1978). Zu Beginn der Analysen wurde daher die Zytotoxizität von Ionomycin bestimmt. Während der Messdauer von einer Stunde verur-

sachte der Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin keinen Zelltod (siehe Abbildung D.4). Interessanterweise konnte auch bei AS-Zellen ein Anstieg der Ionomycin-induzierbaren Calpain-Aktivität verzeichnet werden, dessen prozentualer Anstieg dem der *mock*-Kontrolle vergleichbar war (siehe Abbildung D.3). Folglich scheint die messbare Calpain-Gesamtaktivität in den lebenden AS-Zellen zwar deutlich reduziert zu sein, eine Beeinträchtigung des Aktivierungsmechanismus *per se* aber nicht vorzuliegen.

Neben den AS-Zellen sollte zusätzlich ein System entwickelt werden, das die Regulierung der Expression der beiden konventionellen Calpaine (einzeln und in Kombination miteinander) sowie weiterer potentieller Zielgene mit Hilfe von RNAi erlaubt. Dazu wurde ein vektorielles RNAi-System generiert (vergleichbar mit dem anderer Arbeitsgruppen: ZHOU *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; MIYAGISHI & TAIRA, 2004; MIYAGISHI & TAIRA, 2002).

Für die Herstellung des RNAi-Vektors (pRNAi) wurde das Flp-In System der Firma Invitrogen genutzt, das die spezifische Integration des Vektors in das Genom einer entsprechenden Wirtszelllinie (z. B. Hek293 Flp-in T-Rex) mittels Rekombination ermöglicht (SAUER, 1994). Der Einbau der kodierenden Sequenz des fluorogenen Markers EGFP in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors diente der einfachen Identifizierung und Selektion der transfizierten Zellen. Die Verwendung der *ns*- und *egfp*-Kontrollsequenzen in pRNAi ermöglichte somit in unserem System den Nachweis der spezifischen und effektiven Induzierung von RNAi zunächst in Hek293-Zellen (Abbildung D.26, D.27) sowie anschließend in HeLa-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene.

Durch den Einsatz von Vektor-basierten RNAi-Systemen wurde in manchen Studien eine Induktion der Interferonantwort beobachtet. Die daraus resultierende Aktivierung von Proteinkinase R und der Expression von OAS führt zu einer unspezifischen Degradierung des gesamten mRNA-pools der Zelle (PEBERNARD & IGGO, 2004). Um dies bei dem von uns hergestellten pRNAi-System auszuschließen, wurde die mRNA-Expression von OAS in den pRNAi-transfizierten Zellen bestimmt, wobei keine Änderung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden konnte (Abbildung D.28, A). Darüber hinaus zeigte die Transfektion von pRNAi keine Induzierung des Zelltodes (Abbildung D.28, B). Die jeweiligen Calpain-Zielsequenzen für die Regulation der Expression *via* RNAi wurden mittels definierter Parameter und *online*-Programmen ausgewählt (siehe Kapitel C.1.2). Im Gegensatz zu EGFP, welches eine mittlere Lebenszeit ( $t_{0,5}$ ) von 24 Stunden aufweist (ZHAO *et al.*, 2000), zählen die konventionellen  $\mu\text{CP}$  und  $\text{mCP}$  mit einer  $t_{0,5}$  von 5 Tagen zu den Proteinen mit hoher Verweildauer in der Zelle (ZHANG *et al.*, 1996). Dementsprechend wurden die Zellen alle zwei Tage transfiziert, um eine Transfektionsrate von mindestens 50 % für 5 Tage aufrecht zu erhalten. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen hinsichtlich der reduzierten Protein-Expression und Caseinolyse-Aktivität untersucht (Abbildung D.29). In vergleichbaren Studien konnte ebenfalls nur nach Langzeit-Induktion von RNAi (jedoch mit anderen Zielsequenzen als in unserem Ansatz) eine Reduktion der Calpain-Expression erzielt werden (HONDA *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2004).

Im Vergleich zur transienten Genregulation mittels pRNAi wurde bei den stabilen AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* eine Verringerung von CP4 und Calpastatin festgestellt (Abbildung D.1). Diese Rückkopplung konnte nicht auf unspezifische mRNA-Degradierung als Folge einer möglichen Interferonantwort zurückgeführt werden, da auch bei AS-Zellen keine Erhöhung der OAS mRNA nachweisbar war (Abbildung D.5). Weitere Ursachen für diese Ko-Regulierung in unserem System konnten bisher nicht eruiert werden. Eine Verringerung der CP2-Expression wurde auch bei der Charakterisierung von CP4-KO Fibroblasten detektiert, allerdings konnte diese bisher ebenfalls nicht erklärt werden (ARTHUR *et al.*, 2000).



Für die Analyse isoformspezifischer Calpain-Effekte auf verschiedene zelluläre Mechanismen, wurden zur Gewährleistung der Integrin-Beteiligung *capn1AS*- und *capn2AS*- Zellen sowie die *mock*-Kontrolle subkonfluent auf Fibronectin kultiviert und hinsichtlich der mRNA-Expression von diversen Genprodukten mittels cDNA-Array untersucht (Abbildung D.14). Die in *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen durch die *down*-Regulierung der jeweiligen Calpain-Isoformen beeinflussten Gene und ihre mögliche Bedeutung für verschiedene Zellfunktionen sind in Tabelle E.1 zusammengefasst und sollen nachfolgend detaillierter diskutiert werden.

**Tabelle E.1** *Down- und up-regulierte Gene in stabilen Calpain-AS-Zellen und ihre mögliche Bedeutung für diverse Zellfunktionen*

### **Down-reguliert in *capn1AS***

#### **APOPTOSE**

**Bfl-1** TNF-Rezeptor-vermittelte Umwandlung von **anti-** zu **pro-apoptotischer** Wirkung  
TNF- $\beta$ /Lta Entzündungsreaktionen, **Apoptose**, **Zellproliferation**, Stimulation des **Immunsystems**

#### **ENTWICKLUNG / ZELLWACHSTUM / DIFFERENZIERUNG**

Hoxb-1 RA-induzierbarer Transkriptionsfaktor, wichtig für **Entwicklung** und **Embryogenese**

#### **VERSCHIEDENES**

**iNOS** Produktion von NO als Konsequenz von **Entzündungen**  
**IL-2 Rezeptor** Vermittelt Internalisierung von IL-2 und danach **Differenzierung** oder **Proliferation**  
 **$\alpha$ 2-Makroglobulin** Multivalenter **Proteaseninhibitor**  
Leptin Hormon für die Regulierung des **Fettstoffwechsels** und der Ovulation

### **Down-reguliert in *capn2AS***

#### **APOPTOSE**

**p53** Mediator von Zellzyklusarretierung oder **Apoptose** infolge genetischer Schäden  
**FasL** Ligand für den Fas-Rezeptor (CD95) induziert den extrinsischen **Apoptose**-Signalweg  
**Fas/Apo-1/CD95** Vermittelt Caspase 8-Aktivierung und somit **Apoptose** nach Bindung von Fas  
**IGFBP-3** Vermittelt Phosphorylierung/Inaktivierung von Bcl-2 bei TNF- $\alpha$ -induzierter **Apoptose**  
**Bfl-1** TNF-Rezeptor-vermittelte Umwandlung von **anti-** zu **pro-apoptotischer** Wirkung

#### **TRANSKRIPTION**

**IRF-1** Positiver Transkriptionsfaktor für Gene der **Immunantwort**, **Zellwachstum**, **Apoptose**  
**c-fos** Bestandteil von AP-1; vermittelt Transkription von *early response* Genen  
**JunB** Bestandteil von AP-1; vermittelt Transkription von *early response* Genen

#### **ZELLMIGRATION**

**ICAM-1** Essentiell für die **Invasion** von Brustkrebszellen; Entzündungsreaktionen  
**ELAM/E-Selektin** Marker für **Tumorzellinvasion**; vermittelt Zell-Zell-Adhäsion  
**MMP-7** Proteasen-Überexpression in **malignem** Prostatakrebs  
**PSA** Protease der Kallikrein-Familie ist Marker für **invasives** Prostatakarzinom  
**PGR** Marker für **invasive** Tumore; Rezeptor für Progesteron  
**MIG** Ligand für den Chemokin Rezeptor CXCR3; vermittelt **invasive** Tumorzellmigration

#### **ENTWICKLUNG / ZELLWACHSTUM / DIFFERENZIERUNG**

**Hoxa-1** RA-induzierbarer Transkriptionsfaktor; wichtig für **Entwicklung** und **Embryogenese**  
**Hoxb-1** RA-induzierbarer Transkriptionsfaktor; wichtig für **Entwicklung** und **Embryogenese**  
**EN1** Modulator des Wnt/Dkk-Signalweges; wichtig für **Entwicklung** und **Embryogenese**  
**HIP** Regulator im *hedgehog*-Signalweg; Überexpression bei **malignen** Krebsformen  
**CRBPI** Bindet Retinol; vermittelt Retinolmetabolismus-Signalwege; **Entwicklung**

#### **VERSCHIEDENES**

**IL-2** **Pro-inflammatorisches** Zytokin  
**IL-2 Rezeptor** Vermittelt Internalisierung von IL-2 und damit **Differenzierung** oder **Proliferation**  
 **$\alpha$ 2-Makroglobulin** Multivalenter **Proteaseninhibitor**  
Leptin Hormon für die Regulierung des **Fettstoffwechsels** und der Ovulation

Fortsetzung auf der folgenden Seite



### ***Up-reguliert in capn1AS***

#### **APOPTOSE**

**TNF- $\alpha$**

Induziert den extrinsischen **Apoptose**-Signalweg; stimuliert **Tumorzellinvasion**

**FasL**

Ligand für den Fas-Rezeptor (CD95) induziert den extrinsischen **Apoptose**-Signalweg

**PKC $\epsilon$**

Potentieller Modulator von **Transformation** und **anti-apoptotischer** Aktivität

#### **ZELLMIGRATION**

**VCAM-1**

Marker für **Tumorzellinvasion**; vermittelt Zell-Zell-Adhäsion

WISP-1

Negativer Modulator der **Tumorzellinvasion** durch Rac unterhalb von Integrinen

WISP-2

Marker für **Tumorzellinvasion** und **Transformation** in Brustkrebszelllinien

WISP-3

Potentieller **Modulator von Darmkrebs**

#### **ENTWICKLUNG / ZELFWACHSTUM / DIFFERENZIERUNG**

Patched 1

Element des *hedgehog*-Signalweges; **Zellwachstum**, **Entwicklung** und **Embryogenese**

PMEPA1

Marker für **Differenzierungsvermögen** von Tumorzellen, **wachstumshemmend**

### ***Up-reguliert in capn2AS***

#### **ZELLMIGRATION**

WISP-1

Negativer Modulator der **Tumorzellinvasion** durch Rac unterhalb von Integrinen

#### **ENTWICKLUNG / ZELFWACHSTUM / DIFFERENZIERUNG**

Patched 1

Element des *hedgehog*-Signalweges; **Zellwachstum**, **Entwicklung** und **Embryogenese**

PMEPA1

Marker für **Differenzierungsvermögen** von Tumorzellen, **wachstumshemmend**

Für die in roter Farbe aufgeführten Gene oder Genprodukte sind bereits in der Literatur Zusammenhänge mit Calpain beschrieben worden. Referenzen und nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Anzahl identifizierter *in vivo* Calpain-Substrate steigt mit rasanter Geschwindigkeit und die proteolytische Degradierung von iNOS, p53, IGFBP-3, c-fos, JunB, Bfl-1 und PKC $\epsilon$  durch Calpain wurde bereits gezeigt (WALKER *et al.*, 2001; PIECHACZYK, 2000; GHOSH *et al.*, 2005; CARILLO *et al.*, 1994; KUCHARCZAK *et al.*, 2005; URTHALER *et al.*, 1997; HIWASA *et al.*, 2002). Jedoch gibt es kaum Studien über Korrelationen zwischen dem mRNA-Expressionsniveau der in Tabelle E.1 beschriebenen Moleküle und der Expression oder Aktivität von Calpain.

Mit unserem cDNA-Array zur Untersuchung der Calpain-AS-Zelllinien konnten wir erstmals in größerem Umfang nachweisen, dass zahlreiche, als Calpain-Substrate bekannte Genprodukte auch auf transkriptioneller Ebene Calpain-isoformspezifisch reguliert werden (Tabelle D.1). Ob diese Regulation auf einer reduzierten Calpain-Aktivität als Modulator der Expression anderer Genprodukte beruht, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht werden. Eine cDNA-Array-Analyse von HeLa-Zellen, die mit zellgängigen Calpain-Inhibitoren behandelt wurden, könnte hier möglicherweise zur weiteren Klärung beitragen.

#### ***An der Apoptose beteiligte Gene und/oder Genprodukte***

Apoptose kann durch zwei Hauptsignalwege initiiert werden: (1) einen extrinsischen Signalweg, der durch die Bindung von Liganden an den Rezeptor, wie FasL an Fas/Apo-1/CD95 oder TNF- $\alpha$  an TNFR-1 (BHARDAWAJ & AGGARWAL, 2003) ausgelöst wird, sowie (2) einen intrinsischen Signalweg, bei dem die Auflösung der mitochondrialen Integrität durch Stress oder DNA-Schäden vermittelt wird.

Neben zytotoxischen T-Zellen setzen auch Tumorzellen TNF- $\alpha$  und FasL frei, die nach der Bindung an den jeweiligen spezifischen Rezeptor das Apoptosesignal in das Zellinnere leiten. Dadurch wird das Rezeptor-Adaptorprotein FADD rekrutiert und der gebildete Multienzymkomplex DISC aktiviert Caspase 8 und infolgedessen die *executioner*-Caspasen 3 und 7, welche für die Degradierung von apoptotischen Zielproteinen verantwortlich sind (REED *et al.*, 2004). Die erhöhte Apoptoseneigung von *capn1AS* (Abbildung D.8) könnte eine Konsequenz der gesteigerten Expression von TNF- $\alpha$  und FasL sein. So zeigten in Korrelation zu unseren

morphologischen Daten (Abbildung D.6) FasL-stimulierte Zellen eine Verkleinerung der Zellmorphologie (BORTNER & CIDLOWSKI, 1999). Dabei könnte die erhöhte Expression von NF $\kappa$ B p65 bei *capn1AS* in der späten G1-Phase (Abbildung D.13) die Apoptose noch verstärken, da NF $\kappa$ B p65 die Expression von FasL induzieren kann (HSU *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *capn1AS* konnte bei *capn2AS* eine Verringerung von FasL und Fas/Apo-1/CD95 sowie eine reduzierte Caspase 3/7-Aktivität (Abbildung D.10) und Pro-Caspase 9-Spaltung (Abbildung D.13) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

Darüber hinaus wurde ein Mechanismus unter Beteiligung von IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor binding protein-3*) in Verbindung mit TNF- $\alpha$  bei der Aktivierung des extrinsischen Signalweges vorgeschlagen. Die Überexpression von IGFBP-3 resultierte in der Aktivierung der Caspasen 8 und 9 (BUTT *et al.*, 2005), für die wahrscheinlich eine IGFBP-3-induzierte Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Bcl-2 verantwortlich ist (RAJAH *et al.*, 2002). Kürzlich konnte *in vitro* die Spaltung von IGFBP-4 und -5 durch Calpain gezeigt werden (GHOSH *et al.*, 2005). Inwieweit diese Spaltung jedoch für den Apoptoseprozess von Bedeutung ist, ist unklar. Auch TNF- $\beta$  wird eine Rolle bei apoptotischen Prozessen zugeschrieben (GOETZ *et al.*, 2004). Ob jedoch der verminderten TNF- $\beta$  mRNA-Expression bei *capn1AS* in unserem System (Tabelle D.1) eine Bedeutung bei der Apoptose zukommt, konnte nicht geklärt werden.

Der intrinsische Apoptose-signalweg resultiert als Konsequenz von Stress und DNA-Schäden und ist durch mitochondriale Signale reguliert. Dabei spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle, wobei man pro- und anti-apoptotische Proteine unterscheidet. Die Dysregulation und Degradierung des anti-apoptotischen mitochondrialen Membranproteins Bcl-2 und die Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie z. B. Bax, sind für die Auslösung dieses Signalweges verantwortlich. Bax kann durch das Tumorsuppressorprotein p53 nach Einwirkung von Stress direkt über die pro-apoptotischen Proteine Noxa und PUMA oder durch p53-unabhängige Mechanismen indirekt aktiviert werden (CHIPUK *et al.*, 2004). Die Aktivierung von Bax resultiert wahrscheinlich in seiner Translokation vom Zytoplasma zur Mitochondrienmembran und der Bildung von Poren durch Oligomerisierung. Dadurch gelangt Cytochrom C vom Inneren der Mitochondrien in das Zytosol und bildet zusammen mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 das Apoptosom. Die Aktivierung von Caspase 9 wiederum durch Apaf-1 induziert die Caspase-Kaskade, einschließlich der Aktivierung von Caspase 3 und 7, und vermittelt so das Apoptoseprogramm der Zelle. Die Homöostase der Bcl-2 Proteine ist ein Garant für das Überleben der Zelle. Unsere Gruppe konnte kürzlich die proteolytische Spaltung des pro-apoptotischen Proteins Bid und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und somit die Induzierung der intrinsischen Apoptosekaskade nach Aktivierung von Calpain mit Ionomycin in einem LCLC 103H Zellmodell zeigen (GIL-PARRADO *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann das anti-apoptotische Protein Bfl-1 nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$  und der dadurch induzierten Calpain-vermittelten Spaltung in eine pro-apoptotische Form überführt werden (KUCHARCZAK *et al.*, 2005). Obwohl in beiden AS-Zelllinien die Bfl-1 Transkriptionsexpression vermindert war (Tabelle D.1), kann ein mögliches Zusammenwirken von TNF- $\alpha$ , Bfl-1 und Calpain in *capn1AS* nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren korrelierte die verringerte p53 mRNA-Expression bei *capn2AS* mit der verminderten p53-Konzentration in der späten G1/G0-Phase synchronisierter Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle (Abbildung D.13). Interessanterweise ist dagegen bei *capn1AS* eine Reduktion von p53 und eine Erhöhung eines Spaltproduktes mit anti-p53 zu erkennen (Abbildung D.13). Ob p53 demnach eine Rolle bei der Apoptoseneigung von *capn1AS* spielt, ist anhand unserer Ergebnisse nicht zu entscheiden.

Auch die konstitutive Aktivierung von PKC $\epsilon$  in Krebszellen induziert das Apoptoseprogramm, wobei eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Calpain-Inhibitor Calpeptin die morphologischen Apoptoseindikatoren noch verstärken konnte (REYLAND *et al.*, 2000). Diese

Daten korrelieren mit unseren Ergebnissen der erhöhten PKC $\epsilon$  mRNA-Expression (Abbildung D.15) und der vermehrten *pan* PKC-Aktivität (Abbildung D.59) in *capn1AS*-Zellen, die auch eine erhöhte Apoptoseneigung zeigen. Ein direkter Einfluß von PKC $\epsilon$  auf das Apoptosegeschehen bei *capn1AS*-Zellen müsste jedoch noch durch PKC $\epsilon$ -*knock down*-Studien gezeigt werden.

Generell bleibt zu bemerken, dass die Induktion der Apoptose bei subkonfluenten *capn1AS*-Zellen mit verringerten Zell-Zell-Kontakten auftrat. Zwar wurde in der Literatur ein Verlust dieser Kontakte mit der autokrinen TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose (Anoikis) bei Tumorzellen mehrmals beschrieben (MARCONI *et al.*, 2004; SIMONITSCH & KRUPITZA, 1998), inwieweit jedoch diese Mechanismen in unserem Modell zutreffen konnte nicht geklärt werden.

### **An der Zellmigration und -invasion beteiligte Gene und/oder Genprodukte**

Bei der Analyse der cDNA-Profile hinsichtlich der für die Zellmigration relevanten Gene konnten generell drei Gruppen unterschieden werden: (i) Adhäsionsmoleküle, (ii) extrazelluläre Proteasen sowie (iii) Chemokin- und Hormon-Ligand/Rezeptor Signal-Proteine.

Die cDNA-Array Daten werden in den folgenden Abschnitten primär in Korrelation zu den eigenen oder bereits in der Fachliteratur beschriebenen Zellmigrationsresultaten diskutiert.

#### **(i) Adhäsionsmoleküle**

Die Mitglieder der Zelladhäsionsmolekül-Familien, wie die der Integrine, der CAMs, der Cadherine, der Immunglobuline und der Selektine, vermitteln die Knüpfung von Zell-Zell-Kontakten und/oder die Anheftung einer Zelle an die ECM und in deren Folge membranassoziierte Signalwege (ELANGBAM *et al.*, 1995). Ein in der Blutbahn treibender Leukozyt oder eine Tumorzelle interagiert mit dem aktivierten Endothel, wobei das initiale Gleiten über die Endothelzelloberfläche durch Selektine und Zucker-basierte Liganden vermittelt wird. Anschließend wird die feste Verbindung durch die Interaktion von Integrinen mit den CAMs moduliert (ALEVRIADOU, 2003). Auf die Bedeutung der Integrine bei der Zellmigration wird in den folgenden Abschnitten noch näher eingegangen.

Mitglieder der Selektin- und CAM-Familien sind wichtige Vermittler der Zell-Zell-Adhäsion und ihre Rolle wird vor allem bei der Tumorzellinvasion intensiv diskutiert. So wurde in klinischen Studien die Überexpression von VCAM-1 als Marker bei mehreren metastasierenden Krebsformen identifiziert (SAADS *et al.*, 2004; SAADS *et al.*, 2003). Darüber hinaus korreliert die erhöhte Serumkonzentration von E-Selektin, VCAM-1, und ICAM-1 mit dem invasiven Phänotyp von Tumorzellen, weshalb diese Proteine als Marker für die Tumor- und Metastasenanalytik vorgeschlagen werden (ALEXIOU *et al.*, 2003; READ *et al.*, 1995). Auch *in vitro* konnte die *down*-Regulierung von ICAM-1 auf mRNA- und Proteinebene die Invasion durch eine Matrigelmatrix hemmen (ROSETTE *et al.*, 2005), was unsere Beobachtungen zur reduzierten mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen (Tabelle D.1) in Korrelation zur verringerten Transmigrationsfähigkeit von *capn2AS*-Zellen (Abbildung D.17) untermauert. Die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, wie etwa E-Selektin, VCAM-1, und ICAM-1, wird durch TNF- $\alpha$  und andere pro-inflammatorische Zytokine induziert. Somit wäre eine erhöhte Transkription von VCAM-1 (Tabelle D.1) gemeinsam mit einer gesteigerten Transmigration (Abbildung D.17) bei *capn1AS*-Zellen als Folge der vermehrten TNF- $\alpha$ -Expression (Tabelle D.1) denkbar. Des Weiteren konnte die Expression von ICAM-1 durch die Calpain-Inhibitoren PD150606 und E-64 in einem Ischämie-Reperusions-Modell gehemmt werden (CHATTERJEE *et al.*, 2005), während die Inhibition von Calpain mit Calpeptin in der erhöhten Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in einem inflammatorischen Hyperglycämie-Modell resultiert (STALKER *et al.*, 2003). Wie jedoch diese Regulationen vermittelt werden, ist nicht bekannt.

### (ii) Extrazelluläre Proteasen

Ein weiterer wichtiger Faktor der Zellmigration und -invasion ist die Degradierung extrazellulärer Zielproteine durch Mitglieder der Familien der Metalloproteasen (STERNLICHT & WERB, 2001), Cysteinproteasen (JEDESZKO & SLOANE, 2004) und Serinproteasen (BORGONO & DIAMANDIS, 2004). In Assoziation zur verminderten Transmigration (Abbildung D.17) zeigte die Analyse der cDNA-Arrays auch eine verminderte Expression von MMP-7 und PSA bei *capn2AS*-Zellen (Tabelle D.1). Die Bedeutung dieser Proteasen bei der Tumorzellinvasion wurde in mehreren Studien belegt. Die Überexpression und die damit verbundene erhöhte Degradierung von Proteinen, wie etwa von Integrin  $\beta_4$ , durch MMP-7, wird bei invasivem Prostata- und Gebärmutterhalskrebs beobachtet (MISUGI *et al.*, 2005; VON BREDOW *et al.*, 1997). Ferner ist die proteolytische Aktivität von PSA, einem Mitglied der Kallikrein-Proteasenfamilie, essentiell für die Fähigkeit von Prostatakrebszellen, durch eine Matrigel-Matrix zu wandern (ISHII *et al.*, 2004). Wie die verminderte Expression dieser Proteasen, insbesondere von MMP-7 (siehe auch Abbildung D.15), bei *capn2AS*-Zellen erklärt werden könnte, wird in Abschnitt E.4 näher erläutert.

### (iii) Chemokin- und Hormon/Rezeptor Signal-Proteine

Auch Interaktionen von Chemokinen (TANAKA *et al.*, 2005) und Hormonen (SCHINDLER, 2004) mit den entsprechenden Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und -invasion. Durch die Assoziation des Liganden mit dem Rezeptor werden diverse Signalwege für die Transkription migrationsrelevanter Gene gesteuert. In klinischen Studien wurde eine Überexpression von MIG, auch CXCL9 genannt, bei Lymphknotenmetastasen identifiziert (KAWADA *et al.*, 2004). In unseren Untersuchungen korrelierte eine verminderte Transmigrationsfähigkeit bei Vitronektin-stimulierten *capn2AS*-Zellen mit einer Verringerung der MIG mRNA-Expression (Tabelle D.1). MIG ist wie IP-10 ein Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR3. Die Bindung von IP-10 an CXCR3 induziert eine cAMP-vermittelte Aktivierung von PKA und infolgedessen eine direkte Phosphorylierung von m-Calpain, was eine Inaktivierung der Protease nach sich zieht (SHIRAHARA *et al.*, 2002). Ob MIG die gleiche Signalleitung vermitteln kann, ist noch nicht bekannt.

Als weiterer Marker invasiver Krebsformen wird die Überexpression von PGR in der klinischen Diagnostik diskutiert (TSUTSUI *et al.*, 2003). Zudem konnte die PGR-vermittelte Progesteron-Abhängigkeit der MMP-2-Expression bei humanen Trophoblasten gezeigt werden (GOLDMAN & SHALEV, 2005). Ein derartiger Zusammenhang wird auch durch unsere Untersuchungen bestätigt, da in *capn2AS*-Zellen ebenfalls eine verringerte PGR mRNA-Expression (Tabelle D.1) in Korrelation zur erniedrigten MMP-2-Expression (Abbildung D.52) zu finden ist.

Obwohl der Wnt/Dkk/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade hauptsächlich eine Bedeutung bei der Entwicklung zugesprochen wird, häufen sich die Hinweise auf eine mögliche Beteiligung bei Migrationsprozessen. Die durch diesen Signalweg regulierten Wachstumsfaktoren der CCN-Familie WISP-1, WISP-2 und WISP-3 spielen bei der Zelladhäsion und -proliferation sowie bei der gerichteten Chemokinese eine wichtige Rolle (BRIGSTOCK, 2003). Dabei scheint die Interaktion der WISP-Proteine mit Integrinen wesentlich für diese Prozesse zu sein (GRZESZKIEWICZ *et al.*, 2002). Untersuchungen in Lungenkrebszellen identifizierten WISP-1 als negativen Modulator der Tumorzellinvasion. Die verminderte Invasivität der WISP-1 überexprimierender Zellen wurde auf eine unterhalb von Integrin  $\alpha_v\beta_5$  lokalisierte, Rac-vermittelte verringerte MMP-1 Expression zurückgeführt (SOON *et al.*, 2003). WISP-1 und WISP-2 dürften bei invasiven Brustkrebszelllinien verschiedene Funktionen ausüben, da im Gegensatz zu WISP-1 die mRNA-Expression von WISP-2 mit der Invasivität der Zellen korrelierte (SAXENA *et al.*, 2001; ZOUBINE *et al.*, 2001). Die (patho-)physiologische Rolle von WISP-3 ist noch nahezu unerforscht, jedoch wurde eine Übereinstimmung zwischen der Entstehung von Darmkrebs und der Mutationsrate im WISP-3 Gen identifiziert (THORSTENSEN *et*

*al.*, 2001). Diese Beobachtungen unterstützen zum Teil unsere Ergebnisse aus den Migrationsstudien mit *capn1*AS-Zellen (Abbildung D.17), da die erhöhte Transmigrationsfähigkeit mit gesteigerten Transkriptionsniveaus von WISP-1, WISP-2 sowie WISP-3 (Tabelle D.1) korrelierte.

### ***Bei der Entwicklung, dem Zellwachstum und der Differenzierung beteiligte Gene und/oder Genprodukte***

Die beiden Homöoboxgene Hoxa-1 und Hoxb-1 sind Retinolsäure-regulierte Transkriptionsfaktoren (MARTINEZ-CEBALLOS *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2002). Durch sie wird unter anderem die Transkription des Signalmoleküls BMP-4, der Superoxiddismutase, des Zelladhäsionsmoleküls Cadherin-6 und des Zellzyklusproteins Retinoblastoma-Bindungsprotein-2 reguliert (SHEN *et al.*, 2000). In unserem AS-Zellmodell war die mRNA-Expression von Hoxb-1 bei *capn1*AS- und *capn2*AS-Zellen vermindert, während die Transkriptexpression von Hoxa-1 Calpain-isoformspezifisch nur bei *capn2*AS-Zellen reduziert war. Die Bedeutung dieser Faktoren wurde allerdings nicht weiter untersucht.

Retinol und dessen Derivate sind wichtige Mediatoren von verschiedenen zellulären Prozessen. Innerhalb der Zelle wird Retinol von bestimmten Proteinen, wie etwa CRBPI, gebunden und vermittelt so spezifische Retinol-Metabolismus-Signalwege, die hauptsächlich die Entwicklung von Geweben regulieren (MATT *et al.*, 2005). Welchen direkten Einfluss die verminderte Transkriptexpression von CRBPI bei *capn2*AS-Zellen haben könnte, wurde ebenfalls nicht weiter aufgeklärt.

Bei der Untersuchung von Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans* wurden die zwei konservierten Signalwege *hedgehog* und Wnt/Dkk/ $\beta$ -Catenin identifiziert, die auch in Säugetierzellen mit homologen Signalproteinen entsprechende Aufgaben erfüllen. Eine Dysregulation beider Signalwege wurde bei einer Vielzahl von Krebsformen identifiziert. So zeigt eine Zerstörung von Patched-1 des *hedgehog*-Signalweges (KATANO, 2005) und von EN1 der Wnt/Dkk/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade (BARKER *et al.*, 2000) eine Verbindung zum Transformationsgrad von Zellen. Die Beobachtung der Überexpression des *hedgehog*-Signalmoleküls HIP bei metastasierendem Prostatakrebs (SHENG *et al.*, 2004) steht im Einklang mit der verminderten HIP mRNA-Expression (Tabelle D.1) und Transmigrationsfähigkeit (Abbildung D.17) von *capn2*AS in unserem Zellmodell. Zusätzlich wurde in jüngster Zeit die Hydrolyse von  $\beta$ -Catenin und weiterer Mitglieder der Wnt/Dkk/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade durch Calpain in verschiedenen Brustkrebszelllinien nachgewiesen (RIOS-DORIA *et al.*, 2004).

PMEPA1 wurde ursprünglich als ein durch Androgen induzierbares Gen in Prostatakrebszellen identifiziert. Es weist hohe Sequenzhomologien zu einem Mausprotein auf, das für die Regulation der Ubiquitinierung und der Proteasom-vermittelten Proteindegradierung verantwortlich ist. Die Beobachtung, dass die Überexpression von PMEPA1 in Prostatakrebszelllinien einen wachstumshemmenden Effekt zeigte (XU *et al.*, 2003), stützt unsere Ergebnisse der verringerten Wachstumsfähigkeit von subkonfluenten *capn1*AS-Zellen (Abbildung D.7) in Korrelation zu deren erhöhter mRNA-Expression von PMEPA1 (Tabelle D.1). Im Widerspruch dazu steht allerdings, dass auch in *capn2*AS-Zellen die Transkriptexpression von PMEPA1 erhöht ist, obwohl diese Zellen keine Beeinträchtigung der Proliferation zeigen.

### ***Transkriptionsfaktoren kodierende Gene***

Der Transkriptionsfaktor *activating* Protein-1 (AP-1) spielt neben Prozessen wie dem Zellwachstum, der Differenzierung und der Tumorentstehung bei einer Vielzahl weiterer physiologischer Mechanismen eine wichtige Rolle, indem er die Transkription von *early response* Genen reguliert. Der hetero- oder homodimere AP-1-Komplex besteht aus Mitgliedern der Jun- (c-Jun, JunB und JunD), der fos- (c-fos, fosB, Fra-1, Fra2) und/oder der CREB/ATF-Familie, deren Transkription u. a. durch den ERK/MAPK-Signalweg reguliert wird (TISCHMEYER & GRIMM, 1999). Aufgrund einer geringeren MMP-9 mRNA-Expression nach

Inhibierung von JunB in Neutrophilen wurde von einer Arbeitsgruppe JunB als wichtiges Element der MMP-9-Transkription vorgeschlagen (KANAI *et al.*, 2004). In diesem Kontext war in unseren Studien die direkte Korrelation des verminderten c-fos und JunB mRNA-Niveaus (Tabelle D.1) mit der reduzierten MMP-2-Expression bei *capn2AS*-Zellen (Abbildung D.51) sowie mit der verminderten MMP-2 und MMP-9-Expression bei CP1B präinkubierten THP-1-Zellen (Abbildung D.47) bemerkenswert. Im Kapitel E.4 wird auf diese Beobachtung noch näher eingegangen.

Der Interferon *regulatory factor*-1 (IRF-1) ist ein weiterer positiver Transkriptionsfaktor für Gene der Immunantwort, der Zellwachstumsregulation und der Apoptose in Säugetierzellen. IRF-1 aktiviert die Transkription von Genen infolge von Virusinfektionen, Interferon-Signalen, dsRNA, pro-inflammatorischen Zytokinen und weiteren Faktoren (UPRETI & RATH, 2005). Kürzlich wurde der ERK-Signalweg als Regulator der IRF-1-Transkription identifiziert (PARK *et al.*, 2005). Welche direkte oder indirekte Bedeutung die verminderte mRNA-Expression von IRF-1 insbesondere bei *capn2AS*-Zellen (Tabelle D.1) haben könnte, wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht weiter untersucht.

### **Weitere Gene und/oder Genprodukte unterschiedlicher Funktion**

Die Generierung des Signalmoleküls NO durch iNOS unterliegt einer komplexen räumlichen und zeitlichen Regulierung von iNOS. So sind an der Degradierung von iNOS neben Proteasom- auch Calpain-vermittelte Prozesse beteiligt (KONE *et al.*, 2003). Die Analyse in unserem Zellmodell zeigte eine Verringerung der iNOS mRNA-Expression bei *capn1AS* (Tabelle D.1). Diese Ergebnisse werden durch eine Expressionsstudie von LPS-stimulierten Makrophagen untermauert, da auch hier die Inkubation mit Calpain-Inhibitor I die mRNA-Expression von iNOS hemmen konnte (GRISCAVAGE *et al.*, 1995). Die Bedeutung dieser Resultate für weitere, durch NO regulierte Prozesse wurde in unserem Zellsystem allerdings nicht untersucht. Jedoch zeigten andere Arbeitsgruppen bereits, dass eine geringe NO-Konzentration, die mit verringerter iNOS-Expression korreliert, einen pro-angiogenen Effekt ausübt, während hohe NO-Konzentrationen das Gegenteil bewirken (CHINJE & STRATFORD, 1997).

Die beiden Faktoren IL-2 und IL-2-Rezeptor des T-Zell-Aktivierungssystems spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, wie etwa bei der rheumatischen Arthritis (KOZANIDOU *et al.*, 2005). In Korrelation mit unseren Daten bezüglich einer verminderten mRNA-Expression von IL-2 und IL-2-Rezeptor in *capn2AS*-Zellen (Tabelle D.1), konnte auch in peripheren mononukleären Blutzellen die Expression dieser Faktoren durch Hemmung von Calpain vermindert werden (SCHAECHER *et al.*, 2001). Auf welche Weise jedoch Calpain die Expression der beiden Entzündungsmediatoren reguliert, ist nicht bekannt.

Die Rolle der verminderten mRNA-Expression des Fettstoffwechselhormons Leptin in unseren Calpain-isoformspezifischen AS-Zellsystemen (Tabelle D.1) ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu erklären. Jedoch wurden bei Ratten Zusammenhänge zwischen der Regulation von Leptin und der von Progesteron beobachtet (ROMAN *et al.*, 2005), welches ebenfalls bei unseren *capn2AS*-Zellen verringert ist.

Schließlich soll noch der multivalente Proteaseninhibitor  $\alpha$ 2-Makroglobulin angesprochen werden, der unter anderem als wichtiger Regulator von Entzündungsproteasen angesehen wird (MAKIS *et al.*, 2000). Zwar wurde *in vitro* die Hemmung von Calpain durch  $\alpha$ 2-Makroglobulin gezeigt (CRAWFORD, 1987), die Relevanz dieser Interaktion im zellulären Kontext ist jedoch noch nicht bekannt. Auffälligerweise war die mRNA-Expression von  $\alpha$ 2-Makroglobulin sowohl in *capn1AS*- als auch in *capn2AS*-Zellen deutlich gegenüber der *mock*-Kontrolle vermindert (Tabelle D.1). Welche Bedeutung dies allerdings für die diversen Funktionen der Calpain-AS-Zellen hat, ist derzeit nicht zu erklären.

## E.2 Einfluss von $\mu$ CP und mCP auf den Zellzyklus und die Apoptose

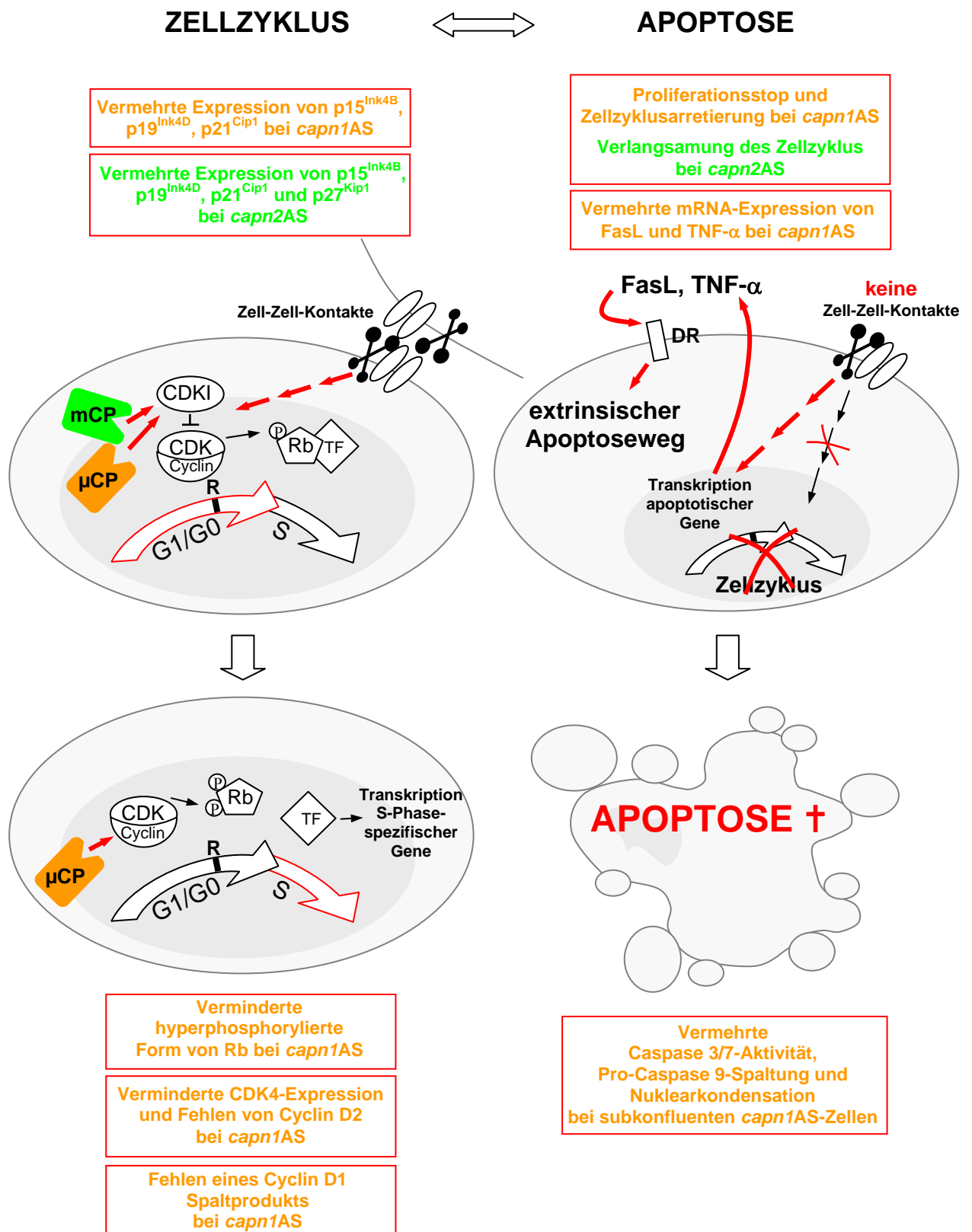
Während der Kultivierung der AS-Zelllinien wurde eine Verringerung der Wachstumsfähigkeit bei *capn1AS* festgestellt. Aufgrund dessen wurden in einem Zelldichte-abhängigen Proliferationsversuch die Wachstumskurven von *capn1AS*-, *capn2AS*- und *mock*-Zellen analysiert. Dabei zeigten subkonfluente *capn1AS*-Zellen sogar einen Wachstumsstop (Abbildung D.7) der mit einem erhöhten Zelltod einherging (Abbildung D.8). Auch von einer anderen Arbeitsgruppe wurde ein Zelldichte-abhängiges Wachstumsverhalten bei CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen nach der Überexpression des endogenen Inhibitors Calpastatin beobachtet (XU & MELLGREN, 2002). Der anti-mitogene Effekt diverser Calpain-Inhibitoren weist zudem auf eine Rolle von Calpain bei der Zellproliferation hin (JANOSSY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 1997). Darüber hinaus resultierte der Einsatz von AS-Oligonukleotiden gegen CP1 in einem verringerten Wachstum von vereinzelter CHO-Zellkolonien (ZHANG *et al.*, 1996).

Bei unserer Untersuchung der einzelnen Zellzyklusphasen von synchronisierten AS-Zellen in geringer Zelldichte konnte eine Arretierung von *capn1AS* und *capn2AS* in der G1/G0-Phase detektiert werden (Abbildung D.12), während die *mock*-Kontrolle in 24 Stunden den Zellzyklus durchlaufen hatte. Bei näherer Betrachtung der einzelnen Komponenten des G1-S-Übergangs konnte ein erhöhter Proteinlevel der Zellzyklus-abhängigen Kinase-Inhibitoren p15<sup>Ink4B</sup>, p19<sup>Ink4D</sup>, p21<sup>Cip1</sup> bei *capn1AS*- und *capn2AS*-Zellen und zusätzlich von p27<sup>Kip1</sup> bei *capn2AS*-Zellen festgestellt werden (Abbildung D.11), was auf  $\mu$ - und m-Calpain als mögliche Zellzyklusinhibitor-degradierende Proteasen *in vivo* hindeutet. Während in der Literatur kein Zusammenhang von p15 mit Calpain-vermittelter Proteolyse und Zellzyklusarretierung beschrieben wurde, sind p19, p21 und p27 als Calpain-Substrate identifiziert worden. In *in vitro*-Calpainolysestudien konnte die Spaltung von p19<sup>Ink4D</sup> gezeigt werden (NALABOTHULA, 2004) und auch unsere Daten deuten auf p19 als potentiell Calpain-Substrat *in vivo* hin (Abbildung D.12) (POPP *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Ein alternativer Weg der p27<sup>Kip1</sup>-Degradierung konnte bei der choroidalen Melanomzelllinie OCM-1 über einen MAPK-regulierten Calpain-Signalweg nachgewiesen werden, da Calpain-Inhibitoren und die Überexpression von Calpastatin eine Akkumulation von p27<sup>Kip1</sup> im Nukleus induzierten (DELMAS *et al.*, 2003). Ferner konnte mittels eines Calpain-Inhibitors die Stabilisierung von p21<sup>Waf1/Cip1</sup> und eine Zellzyklusarretierung in G1 bei der Brustkrebszelllinie MCF7 und der murinen Lungenzelllinie E10 Typ II beobachtet werden (KHAN *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde aufgrund von Experimenten mit dem synthetischen Calpain-Inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN) vermutet, dass Calpain für den Umsatz von p27 bei der mitotischen klonalen Expansion während der Differenzierung von subkonfluenten Präadipocyten verantwortlich ist (PATEL & LANE, 2000).

Die Beteiligung der konventionellen Calpaine bei der Zellproliferation wird jedoch kontrovers diskutiert, da eingesetzte Calpain-Inhibitoren nicht absolut spezifisch für Calpaine sind, und murine CP4-KO-Stammzellen, die keine Expression der regulatorischen Untereinheit von  $\mu$ CP und mCP aufweisen, ein unverändertes Wachstumsverhalten gegenüber murinen *Capn4*<sup>+/+</sup>-Stammzellen zeigten (ARTHUR *et al.*, 2000). Andererseits wurde mittels Calpeptin und ALLN eine Hemmung der seruminduzierten Zellzyklusprogression am G1-S-Übergang bei glatten Aortamuskelzellen und eine weitere Blockierung bei der G2-M-Grenze festgestellt (MARCH *et al.*, 1993). Die Analyse Proteasen-spezifischer Inhibitoren zeigte die Bedeutung von Calpain beim G1-S-Übergang. Während Z-LLY-FMK als Calpain-Inhibitor einen Stop der Zellzyklusprogression in der späten G1-Phase bewirkte, konnten keine Veränderungen der Zellzyklusphasen mit den Proteasom-Inhibitoren Z-LLnV-CHO und Z-LLL-CHO bei WI-38 Fibroblasten beobachtet werden (MELLGREN, 1997).

Über die Induktion der G1-Cycline und die Suppression von G1-Cyclin-Inhibitoren sind Integrin-vermittelte Signale für die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus verantwortlich. Im Gegensatz zu nicht-transformierten Zellen, die die Bindung zur ECM über Integrine und den damit assoziierten PKB/Akt-Signalweg für das Zellwachstum benötigen, zeigen transformierte Zellen (Tumorzellen) eine konstitutive Aktivierung dieser Signalwege (DANEN & YAMADA, 2001). Durch die Hemmung dieser Signalwege werden die Zellen in einer Phase des Zellzyklus arretiert und/oder das zelleigene Apoptoseprogramm induziert. In unserem AS-Zellsystem korrelierte der mit dem Wachstumsstop einhergehende erhöhte Zelltod mit spezifischen Apoptosemarkern. So zeigten subkonfluente, synchronisierte *capn1*AS-Zellen im Vergleich zur *mock*-Kontrolle und zu *capn2*AS-Zellen *in vivo* eine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität (Abbildung D.10) und Nuklearkondensation (Abbildung D.9) sowie eine vermehrte Spaltung von Pro-Caspase 9 in der späten G1-Phase (Abbildung D.12). Die erhöhte Apoptoseneigung von *capn1*AS-Zellen wurde von einer Cyclin D1-Persistenz, der Abwesenheit von Cyclin D2, einem verminderten Proteinlevel von CDK4 und einer verringerten Expression von Phospho-Rb begleitet (Abbildung D.13). Da die Apoptose nur bei subkonfluenten *capn1*AS-Zellen auftrat, ist als Grund ein Mangel an spezifischen Zell-Zell-Kontakten denkbar. Ob zudem jedoch die Induzierung der Apoptose bei subkonfluenten *capn1*AS-Zellen auf einen Defekt spezifischer Signalwege (z. B. des PKB/Akt-Weges) zurückzuführen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. In Abbildung E.1 sind die einzelnen potentiell durch Calpain-modulierten Apoptose- und Zellzyklusfaktoren noch einmal zusammengefasst dargestellt.





**Abbildung E.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Zellzyklus und der Apoptoseinduktion.**

Ausführliche Erklärung siehe Text auf der vorherigen Seite. R, Restriktionspunkt; DR, death receptor; CDKI, CDK Inhibitor.

### E.3 Calpaine als isoformspezifische Modulatoren der Zellmorphologie und Tumorzellmigration

Die Beteiligung der Calpaine als Positivregulatoren bei der Migration und Invasion von primären Zellen und Tumorzelllinien wird intensiv diskutiert (LOKUTA *et al.*, 2003; MAMOUNE *et al.*, 2003; KASSIS *et al.*, 2002). Jedoch wurde in diesen Studien nur teilweise auf die Bedeutung der einzelnen Calpain-Isoformen eingegangen.

#### ***Calpain-isoformspezifische Zellmorphologie und Transmigrationsfähigkeit***

Bei der Analyse CP4-defizienter Fibroblasten konnte die essentielle Rolle der konventionellen Calpaine bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts gezeigt werden (DOURDIN *et al.*, 2001). So wiesen primäre und immortalisierte CP4-KO-Fibroblasten Anhäufung von dünnen Membranfortsätzen und vermehrte transiente, dynamische Membranaktivitäten auf (DOURDIN *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2004). Die stabile Integration von siRNA-Konstrukten gegen *capn1* und *capn2* in einer Fibroblastenzelllinie führte nur bei einer Verminderung von CP2 (80K-Untereinheit von m-Calpain) zu einer ähnlichen Morphologie, wie sie bei immortalisierten *Capn4*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten auftrat, während die Reduzierung von CP1 (80K-Untereinheit von  $\mu$ -Calpain) keinen Effekt auf die Zellmorphologie zu haben schien (FRANCO *et al.*, 2004). Entsprechend dieser Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen ergab die Analyse unserer AS-Zellen, dass die Reduktion von CP2 bei *capn2*AS-Zellen den gleichen morphologischen Effekt wie bei CP4-KO-Zellen, denen nur die gemeinsame kleine Untereinheit von  $\mu$ - und m-Calpain fehlt, zur Folge hat. Das Erscheinungsbild von *capn2*AS-Zellen mit langgestreckten, filopodienartigen Ausstülpungen (Abbildung D.6) wies deutliche Ähnlichkeiten zu *Capn4*<sup>-/-</sup>- und CP2-defizienten Fibroblasten auf, was auf eine Störung der Reorganisation der fokalen Adhäsionen in diesen Zellen hindeutet (FRANCO *et al.*, 2004). Wie bei den AS-Zellen führte auch die Verminderung von CP2 und CP4 durch pRNAi in HeLa-Zellen zu einer langgestreckten Zellmorphologie (Abbildung D.30).

Interessanterweise zeigte jedoch die Reduktion von CP1 mittels AS-Konstrukten und siRNA, im Gegensatz zu bereits beschriebenen Daten (FRANCO *et al.*, 2004), ebenfalls eine deutlich veränderte Morphologie (Abbildung D.6 und D.30). Die Tatsache, dass *capn1*AS-Zellen nicht in der Lage sind, ein F-Aktin-Netzwerk auszubilden und den Zellkörper durch eine Lamellipodien-Front zu polarisieren, spricht für eine Beeinträchtigung der Aktivität von RhoA-GTPasen. Die Akkumulation von RhoA in *capn1*AS weist darauf hin, dass es ein durch  $\mu$ -Calpain-reguliertes Substrat in diesen Zellen sein könnte (Abbildung D.32). Gestützt wird diese Vermutung von Ergebnissen, bei denen die Überexpression von RhoA in der aggressiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 ein kortikales Feld von F-Aktin, eine abgerundete Morphologie, ein verringertes Ausbreitungspotential und eine erhöhte Zellmotilität induzierte (CACERS *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie, bei der BAE-Zellen eine verkürzte RhoA-Variante exprimierten, welche auch durch eine Calpain-Hydrolyse entsteht, wurde eine verringerte Integrin-vermittelte Ausbildung von F-Aktin-Stressfasern und eine reduzierte Fähigkeit, sich auf dem Substrat Fibronectin auszubreiten, beobachtet (KULKARNI *et al.*, 2002). Die in der Literatur beschriebenen Daten und unsere Ergebnisse sprechen für RhoA als potentielles Substrat von  $\mu$ -Calpain und für die Hypothese, dass  $\mu$ CP über den Abbau von RhoA die Fähigkeit zur Zellmigration negativ modulieren kann.

Auch die Überexpression von Calpastatin in C2C12-Myoblasten resultierte in einer abgerundeten Morphologie, dem Verlust von Membranfortsätzen und der Dysorganisation von F-Aktin-Stressfasern. Die Zellen waren nicht in der Lage, neue Adhäsionen auszubilden. Allerdings zeigte sich in diesen Studien keine proteolytische Veränderung von den bereits beschriebenen Calpain-Substraten Desmin, Talin, Vinculin, FAK, Ezrin, Radixin oder Moesin, jedoch aber von MARKS, dem myristylierten Ala-reichen C-Kinase-Substrat, dessen Aufgabe bei der Bildung des strukturellen Bestandteils des Zytoskeletts liegt (DEDIEU *et al.*, 2004).

Auf der anderen Seite haben wir eine Akkumulierung der Gesamtmenge und der aktiven GTP-gebundenen Form von Cdc42 bei CP1- und CP2-verminderten HeLa Zellen detektiert (Abbildung D.32). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde durch die Hemmung von Calpain in IL-8-stimulierten Neutrophilen eine Erhöhung der Cdc42- und Rac-Aktivität beobachtet (LOKUTA *et al.*, 2003). Obwohl Cdc42 als Regulator der Neubildung von Filopodien verantwortlich gemacht wird (SCHMITZ *et al.*, 2000), zeigten neue Studien mit Cdc42-defizienten fibroblastoiden Zellen, dass dieses RhoA-Familienmitglied nicht für die Formation von Filopodien, die gerichtete Zellmigration, die Zellpolarisation und die Mitose essentiell ist (CZURCHA *et al.*, 2005). Somit ist die Rolle von Cdc42 bei Migrationsprozessen weiterhin unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse der Calpain-Beteiligung bei der zellulären Migration die etablierte Leukämiezelllinie THP-1 und die Adenokarzinomazelllinie HeLa verwendet. In initialen Versuchen zeigte ausschließlich die Langzeit-Hemmung von Calpain mit spezifischen Calpain-Inhibitoren eine Verringerung der Transmigration durch eine rekonstituierte Matrix (Abbildung D.16), was auf einen Calpain-Effekt auf transkriptionelle Regulationsmechanismen komplexer Signalkaskaden hinweist. Jedoch bewirkte die Verminderung der CP1- und CP2-Expression eine gegensätzliche Beeinflussung der Transmigrationsfähigkeit, wobei  $\mu$ CP einen negativen Einfluss zu haben scheint, während mCP essentiell für die Transmigration ist (Abbildung D.17).

Die Transwell-Modelle wurden mit Matrigel, einer rekonstituierten Basalmembranmatrix des murinen Engelbreth Holm-Swarm-Tumors, durchgeführt (HENDRIX *et al.*, 1987). Die Zusammensetzung von Matrigel, u. a. aus Laminin, Kollagen IV und Entactin sowie den Wachstumsfaktoren EGF, PDGF, IGF-1 und TGF- $\beta$  bestehend, ist sehr komplex (KLEINMAN *et al.*, 1982). Für die Klärung, ob die unterschiedlichen Transmigrationsneigungen von CP1- und CP2-verminderten Zellen möglicherweise auf einer Calpain-isoformabhängigen Fähigkeit der Zellen beruht, an diverse ECM-Komponenten unterschiedlich zu adhären, wurden daher in einem definierten System Transwell-Membranen einzeln mit den ECM-Proteinen Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen IV beschichtet. Außerdem wurden die Zelllinien *capn1AS*, *capn2AS* und *mock* zuvor auf das Vorhandensein der jeweiligen Integrine als wesentliche Rezeptoren für die Bindung der Zellen an die genannten ECM-Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft (Abbildung D.18). Auffälligerweise war im Gegensatz zu Vitronectin und Fibronectin, bei Laminin und Kollagen IV, die von RGD-unabhängigen Integrinen erkannt werden, die Transmigration von *capn1AS*-Zellen gegenüber der *mock*-Kontrolle nicht erhöht, während *capn2AS*-Zellen immer eine verringerte Transmigration aufwiesen (Abbildung D.19). Zu klären, ob dies mit einem möglichen Calpain-isoformabhängigen unterschiedlichen Integrin-Aktivierungsmechanismus zusammenhängt, war daher ein weiteres Ziel dieser Promotionsarbeit. Die entsprechenden Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

Im Hinblick auf weitere in den Migrationsprozess involvierte Adhäsionsmoleküle ist, wie in Abschnitt E.1 erwähnt, das hohe mRNA-Expressionsniveau von VCAM-1 ein auffälliges Merkmal von *capn1AS*-Zellen (Tabelle D.1). So konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von VCAM-1 mit der Invasivität von Gliomakarzinomzellen korreliert, während bei normalen Gehirnzellen kein derartiger Zusammenhang gefunden wurde (MAENPAA *et al.*, 1997). Ferner wurde in zellbasierten Studien eine Verbindung zwischen der Expression von VCAM-1 und der Fibronectin-stimulierten erhöhten Zellmigration festgestellt (MOYANO *et al.*, 2003). Hierbei ist bemerkenswert, dass VCAM-1 nicht direkt mit ECM-Komponenten assoziiert, sondern als Interaktionspartner des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  dessen Aktivierung vermittelt. In der genannten Studie war auch eine Korrelation zwischen der Expression von VCAM-1 und der *down*-Regulierung von RhoA sowie der damit verbundenen Blockierung der Fibronectin-induzierten Formation von F-Aktin-Stressfasern und fokalen Adhäsionen bei HeLa-Zellen

festgestellt worden. Somit unterstützt diese Beobachtung unsere Ergebnisse der erhöhten Transmigration von *capn1*AS-Zellen durch Matrigel, Vitronektin und Fibronektin in Verbindung mit einer vermehrten VCAM-1-Expression.

### ***Calpaine und Integrin-assoziierte intrazelluläre Faktoren***

Die beeinträchtigte Transmigration von *capn2*AS-Zellen deutete auf eine Störung der Reorganisation fokaler Adhäsionen hin. Bei genauerer Analyse der Transmigration durch die mit einzelnen ECM-Proteinen beschichteten Filtermembranen zeigte sich, dass die Behandlung mit Antikörpern gegen die entsprechenden Integrine nicht in einer Veränderung (Hemmung) des Transmigrationsverhaltens resultierte (Abbildung D.19). Dies konnte bereits als wesentlicher Hinweis auf eine generelle Beeinflussung der Integrin-Signalübertragung gewertet werden. Auch die Tatsache, dass *capn2*AS-Zellen zwar in der Lage sind, Vitronektin-stimuliert den Zellkörper nach vorne zu bewegen, aber nicht die Kehrseite abzulösen, spricht für eine Hemmung der Integrin/Zytoskelettumbaumechanismen (Abbildung D.21). Darüber hinaus zeigten *capn2*AS-Zellen eine verringerte Liganden-Bindungsaffinität, was auf eine Beeinflussung der Überführung von einem inaktiven, Liganden-ungebundenen zu einem aktiven Zustand des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  hindeutet (Abbildung D.20). Unsere Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen von Huttenlocher und Mitarbeitern, dass die Hemmung von Calpain mittels spezifischer Inhibitoren die  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -vermittelte Zellmigration verhindern kann (HUTTENLOCHER *et al.*, 1997).

Ausgehend von diesen Befunden wurde die Expression und Aktivität Integrin-assoziiierter Proteine der fokalen Adhäsionen, die bei der Signalübertragung eine Rolle spielen, näher betrachtet. Calpain scheint bevorzugt Substrate an der Zytoplasmamembran zu spalten, da nach Ionomycin-vermittelter Aktivierung der basalen Calpaine deren Translokation an die Plasmamembran beobachtet wurde (GIL-PARRADO *et al.*, 2003). Von den fokalen Adhäsions-Proteinen Talin, FAK, Ezrin und Vinculin ist bekannt, dass sie durch Calpain gespalten werden können (GLADING *et al.*, 2002). Jedoch erlauben diese auf Inhibitorstrategien beruhenden Ergebnisse keine Unterscheidung einer potentiell isoformspezifischen Hydrolyse durch Calpaine. Die Analyse von *capn1*AS- und *capn2*AS-Zellen zeigte nun erstmals eine Calpain-isoformunspezifische Verstärkung der Vinculin-Bande als Ausdruck einer mangelhaften proteolytischen Spaltung durch Calpaine, während eine Erhöhung der Ezrin-Bande sowie ein Fehlen der Talin-Hydrolyse (Abbildung D.33, A) spezifisch auf die *down*-Regulation von CP2 zurückgeführt werden konnte. Das in der Literatur diskutierte Calpain-Substrat FAK wies in unseren Experimenten dagegen keine Änderung in der Proteinmenge auf (Abbildung D.33, A). Die transiente *down*-Regulierung von CP2 und CP4 in *capn2*RNAi- und *capn4*RNAi-Zellen resultierte zudem in einer Verringerung der Talin-Spaltung (Abbildung D.33, B). Unsere Ergebnisse identifizierten somit Talin, das über Integrine die ECM mit dem filamentösen F-Aktin-Zytoskelett verbindet, und möglicherweise auch Ezrin als spezifisches m-Calpain-Substrat. Unsere Resultate werden zum Teil auch durch eine weitere Studie bestätigt, in der m-Calpain für die Proteolyse der Zytoskelett- und fokalen Adhäsionsproteine FAK, Paxillin, Spectrin und Talin in einer Fibroblastenzelllinie verantwortlich gemacht wird (FRANCO *et al.*, 2004). Inwieweit jedoch die Calpain-vermittelte Hydrolyse von FAK spezifisch nur in bestimmten Zelltypen vorkommt, bleibt noch zu klären.

### ***Calpain und Talin***

Talin ist eine Hauptkomponente von fokalen Adhäsionen und spielt bei der Zellmigration eine essentielle Rolle. Dies wurde z. B. bei der Analyse von Talin-KO-Mäusen deutlich, da die Tiere in der frühen embryonalen Phase zwischen Tag 8,5 und 9,5 starben, wahrscheinlich infolge dramatischer Defekte bei der Zellmigration und Gastrulation (MONKLEY *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigen Talin-KO-Trophoblastenzellen eine deutliche Reduzierung der Zellausbreitung auf Fibronektin und Laminin, was für eine verminderte Liganden-Bindungsaffinität der jeweiligen Integrine spricht (MONKLEY *et al.*, 2000).

In weiteren Studien sollte nun geklärt werden, welchen Beitrag Talin und insbesondere die potentiell durch mCP-generierten Spaltprodukte zur Aktivierung von Integrinen leisten. Ausgehend von der Tatsache, dass eine C-terminal verkürzte Talin-Variante (in unseren Studien nur Talin genannt) in der Lage ist, *in vitro* Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu aktivieren, eine Talin-Variante ohne N-terminale Kopfregion (*head*) jedoch nicht, deutet auf die essentielle Rolle der *head*-Polypeptidkette bei der Zellmigration hin (CALDERWOOD *et al.*, 2002). Für die genaue Aufklärung der tatsächlichen Rolle der Talin-Proteolyse bei der Zellmigration und -transmigration wurden daher Talin-EYFP-Fusionsvarianten hergestellt (Abbildung D.35) und in HeLa-Zellen überexprimiert. Dabei zeigten sowohl Talin-EYFP und Talin *rod*-EYFP vornehmlich eine diffuse Verteilung im Zytoplasma, während Talin *head*-EYFP an der Zytoplasmamembran akkumulierte (Abbildung D.38), was auf die potentielle mCP-vermittelte Spaltung von Talin als initialen Prozess der Translokation zu Membranstrukturen hinweist. Dies wurde besonders auch durch die Analyse der Migrationseigenschaften von *capn2AS*-Zellen klar, die mit diesen Talin-Varianten transfiziert waren. Die Überexpression von Talin *head*-EYFP war ausreichend, um die Migration der CP2-verminderten Zelllinie wieder auf das Niveau der *mock*-Kontrolle anzuheben (Abbildung D.39). Somit scheint die proteolytische Spaltung von Talin zu den *head*- und *rod*-Domänen für die Bildung der Fibronektin-induzierten fokalen Adhäsionen essentiell zu sein, wie in Versuchen von Franco *et al.* mit einer Calpainolyse-resistenten Talin-Variante L<sup>432</sup>G gezeigt werden konnte. Hier war die Ausbildung der fokalen Adhäsionen signifikant verringert (FRANCO *et al.*, 2004).

Eine weitere Studie zur Integrin-Aktivierung deutete auf eine limitierte Anzahl an zytoplasmatischen Bindungspartnern hin, die die *inside-out*-Signaltransduktion vermitteln (CHEN *et al.*, 1994). In den folgenden Jahren wurde die Bindung von Talin an die zytoplasmatische  $\beta$ -Untereinheit von Integrinen als essentieller Schritt bei der Aktivierung von Integrinen identifiziert (TADOKORO *et al.*, 2003). Dabei spielt die FERM-Domäne von Talin *head* bei der Bindung an das NPx(Y/F)-Motiv der Integrin  $\beta$ -Untereinheit die entscheidende Rolle (CALDERWOOD *et al.*, 2002). Die verringerte Reorganisation von fokalen Adhäsionen resultiert folglich in einer verlangsamten, generell beeinträchtigten Ablösung von Zell-ECM-Kontakten, was die verminderte Migrationsfähigkeit von *capn2AS*-Zellen erklären könnte.

Mutagenesestudien an der Spaltstelle des Calpain-Substrates  $\alpha$ II-Spectrin zeigten darüber hinaus, dass keine spezifischen Aminosäurereste, sondern vielmehr die Sekundär- und Tertiärstruktur die Verfügbarkeit eines Moleküls als Calpain-Substrat bestimmen (STABACH *et al.*, 1997). Dementsprechend konnten Tompa *et al.* anhand einer Analyse der publizierten Calpain-Spaltstellen nur Präferenzen für verschiedene Aminosäuren in der Nähe der Spaltstelle angeben (TOMPA *et al.*, 2004). Ausgehend von diesen Daten haben wir in einem weiteren Versuchsansatz eine Calpainolyse-resistente (Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP) und -sensitive (Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP) Talin-Mutante generiert, um unsere Hypothese der mCP-vermittelten Spaltung von Talin näher zu analysieren. In unseren Experimenten war sowohl die Kollokalisierung von Talin Y<sup>436</sup>P-EYFP mit dem F-Aktin-Zytoskelett (Abbildung D.45) als auch die Zellmigration und -transmigration deutlich im Vergleich zu Talin L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M-EYFP und den Kontrollen erhöht (Abbildung D.46), was auf eine wichtige Rolle der Calpain-vermittelten Proteolyse von Talin bei der Zellmigration hindeutet.

### ***Calpain-Aktivität und Kehrseitenablösung migrierender Zellen***

Ein Hinweis, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Phosphorylierungsprozesse bei der Bildung und Lösung von fokalen Adhäsionen wichtige Rollen spielen, wurde in Studien mit der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierten Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin für die gestörte Kehrseiten-Ablösung und verringerte Migration von Vitronektin-adhärenenten neutrophilen Granulozyten gezeigt (HENDEY *et al.*, 1992, HENDEY & MAXFIELD, 1993). Die Behandlung dieser Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Integrin-Untereinheit  $\alpha_v$  oder das Integrin-Gesamtmolekül  $\alpha_v\beta_3$  konnte die Ablösung von Vitronektin und die Migration wieder herstellen (HENDEY *et al.*, 1996). Zudem verhinderte die Komplexbildung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. die Hemmung von Calcineurin die Konzentrierung von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  an der Zellvorderseite (LAWSON & MAXFIELD, 1995). Zwar wurden diese Beobachtungen nicht direkt mit der Calpain-Aktivität in Verbindung gebracht, jedoch gilt es als sehr wahrscheinlich, dass diese Prozesse durch Calpaine vermittelt werden, insbesondere da Phosphorylierungen als Modulator der Calpain-Aktivität intensiv diskutiert werden (GOLL *et al.*, 2003). In einem weiteren zellbasierten Versuchsansatz konnte mit dem Calpain-Inhibitor ALLN und mit dem spezifischen MEK1/2-Inhibitor PD98059 die EGF-induzierte Zellablösung von NR6-Fibroblasten verhindert werden (ALLEN *et al.*, 2002). Auch die *down*-Regulierung von CP2 durch AS-Technik und die Hemmung der Calpaine mit ALLN und Leupeptin in Prostatakrebszelllinien zeigten die Bedeutung von mCP bei Migrationsprozessen auf, wobei eine Verringerung der Migrationsfähigkeit der hoch invasiven Subzelllinie PA DU-145 beobachtet wurde (MAMOUNE *et al.*, 2003). Ob eine gestörte Kehrseitenablösung aufgrund der Calpain-Reduktion dafür verantwortlich ist, wurde allerdings nicht untersucht.

Der komplex regulierte Prozess der Auflösung von Zelladhäsionen an der Kehrseite einer migrierenden Zelle ist bis zum heutigen Zeitpunkt nur in Ansätzen verstanden. Jedoch zeigen unsere Daten (Abbildung D.17) und in der Fachliteratur beschriebene Resultate (GLADING *et al.*, 2002), dass Calpaine in diesen Prozess involviert sein müssen. Zusätzlich zu der bereits bestehenden Hypothese einer räumlich- und zeitlich-regulierten Proteolyse fokaler Adhäsionen durch Calpaine konnte anhand unserer AS- und -RNAi-Zellmodelle eine isoformspezifische Beteiligung von Calpainen an Migrationsprozessen detektiert werden. Obwohl die Spaltung von Talin zu *head* und *rod* durch m-Calpain essentiell für die Aktivierung von Integrinen (Adhäsion zu ECM-Proteinen) und der Migration zu sein scheint, bleibt eine wichtige Frage, wie die räumliche Verteilung von Calpainen bei diesem Prozess reguliert wird. Eine mögliche Erklärung bezieht sich auf die Fähigkeit von Talin und Calpain, Phospholipide zu binden. So konnte z. B. während der Zellmigration eine asymmetrische Konzentrierung von  $\text{PIP}_2$  an der Kehrseite migrierender Zellen beobachtet werden (Dr. Allan Wells, persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass aktivierte Calpaine mit der Zytoplasmamembran assoziieren (GIL-PARRADO *et al.*, 2003) und m-Calpain dabei vornehmlich in diesen Strukturen zu finden ist (GLADING *et al.*, 2002), lässt eine isoformspezifische proteolytische Funktion bei der Kehrseitenablösung vermuten. Die Überexpression von Talin *head* in *capn2AS*-Zellen konnte die im Vergleich zur *mock*-Kontrolle verminderte Transmigrationsfähigkeit wieder herstellen (Abbildung D.39). Ob diese rekonstruierte Transmigrationsfähigkeit z. B. auf eine mögliche Auflösung der fokalen Adhäsionen durch Verdrängung anderer endogener zytoplasmatischen Integrin-Bindungspartner ( $\alpha$ -Actinin, ILK, Filamin) beruht, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

Generell scheint jedoch die m-Calpain-Aktivität ein wichtiger Modulator der Migration zu sein, da eine Erhöhung der ECFP-Fluoreszenz bei ECFP-CP2 überexprimierenden *capn2AS*-Zellen an der Kehrseite beobachtet werden konnte und mit einer intakten Ablösung assoziiert war (Abbildung D.23).

### ***Calpain und Substratspezifität***

Obwohl bis zum heutigen Tage weit mehr als hundert Calpain-Substrate bekannt sind, konnte eine einheitliche Erkennungssequenz der Substratpolypeptide nicht identifiziert werden. Zwar wurde in einer vergleichenden Sequenzanalyse bekannter Calpain-Substrate (TOMPA *et al.*, 2004) und in einem weiteren Ansatz mit einer Peptid-Bibliothek (CUERRIER *et al.*, 2005) mögliche Calpain-„Supersubstrate“ identifiziert, aber schon die Tatsache, dass sich diese beiden Polypeptide nicht ähneln, spiegelt die komplexe Erkennungsregulierung von physiologischen Calpain-Substraten wider.

Zudem sind die Mechanismen zur Erkennung Calpain-isoformspezifischer Substrate nur in Ansätzen verstanden. Obwohl in unseren Studien (Tabelle E.2) und bei anderen Arbeitsgruppen isoformspezifische Calpain-Substrate identifiziert wurden (WANG *et al.*, 2005; SATISH *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2004; KULKARNI *et al.*, 2002), konnten die molekularen Mechanismen der Substraterkennung noch nicht erklärt werden.

In diesem Kontext ist erwähnenswert, dass zwar die Bedeutung von PEST-Sequenzen für die Calpainolyse von Substraten *in vivo* intensiv diskutiert wird (MARIE *et al.*, 2005), dieses Substrat-Kriterium jedoch kritisch betrachtet werden muss. So wiesen nur die in unseren Experimenten identifizierten potentiellen Substrate Talin, Cyclin D1, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> derartige Sequenzen auf (Tabelle E.2). Alle weiteren in unserer Studie identifizierten möglichen Substrate teilen weder PEST-Sequenzen noch irgendwelche anderen strukturelle Ähnlichkeiten.

**Tabelle E.2** *In dieser Arbeit identifizierte potentiell isoformspezifische Calpain-Substrate*

<b>Substrat</b>	<b>Spezifität<sup>*</sup></b>	<b>PEST<sup>**</sup></b>	<b>Referenz<sup>***</sup></b>
Talin	mCP	x	FRANCO <i>et al.</i> , 2004 (mCP)
Ezrin	mCP	-	WANG <i>et al.</i> , 2005 (μCP)
Vinculin	μCP / mCP	-	SATISH <i>et al.</i> , 2005 (μCP)
RhoA	μCP	-	KULKARNI <i>et al.</i> , 2002 (μCP)
Cdc42	μCP / mCP	-	-
Cyclin D1	μCP	x	-
p15 <sup>Ink4B</sup>	μCP / mCP	-	-
p19 <sup>Ink4D</sup>	μCP / mCP	-	-
p21 <sup>Cip1</sup>	μCP / mCP	x	-
p27 <sup>Kip1</sup>	mCP	x	-

<sup>\*</sup>In dieser Arbeit identifizierte Isoformspezifität der Calpain-vermittelten Hydrolyse; <sup>\*\*</sup>Untersuchung auf Vorhandensein von PEST-Sequenzen mittels PESTfinder (siehe C.1.2); <sup>\*\*\*</sup>Referenzen zu isoformspezifischen Calpain-vermittelten Hydrolysen der entsprechenden Substrate *in vivo*.

In einer computerunterstützten Analyse der Sekundärstruktur des Talin *head-rod-linkers* von Talin-Wildtyp und der Calpainolyse-sensitiven (Y<sup>436</sup>P) bzw. -resistenten Mutanten (L<sup>432</sup>G, L<sup>432</sup>A/Q<sup>435</sup>R/N<sup>437</sup>M) zeigte eine mögliche Bedeutung von β-Faltblattstrukturen auf, die die Spaltstelle von Talin Y<sup>436</sup>P (Q<sup>433</sup>-Q<sup>434</sup>) überspannende Polypeptidkette ausbildet (Abbildung D.43).

Die generelle Bedeutung dieses Strukturmerkmals für die Calpain-Spaltung muß in Zukunft jedoch noch detaillierter untersucht werden.

#### E.4 Korrelation der Transkription von MMP-2 mit der Aktivität von m-Calpain

Der Mechanismus der kürzlich beschriebenen Calpain-Beteiligung bei der Expression von MMPs in transformierten Zellen ist noch völlig unklar (POSTOVIT *et al.*, 2002). Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit initial Inhibitor-basierte Studien an THP-1- und HeLa-Zellen durchgeführt und anschließend das MMP-Expressionsniveau bei den Calpain-AS-Zelllinien sowie den Calpain-RNAi-Zellen analysiert.

Der Einsatz der spezifischen Calpain-Inhibitoren CP1B (GIL PARRADO *et al.*, 2002) und CI4 (DUTT *et al.*, 1998) bewirkte nach einer Langzeit-Präinkubation von 24 Stunden eine Verringerung der Protein- und mRNA-Expression von MMP-2 in der Adenokarzinomzelllinie HeLa sowie der von MMP-2 und MMP-9 in der monozytären Leukämiezelllinie THP-1 (Abbildung D.47 und D.51). Zudem war der Calpain-vermittelte Effekt der MMP-Expressionshemmung unabhängig vom Differenzierungsgrad bei THP-1 (Abbildung D.48 und D.49) (POPP *et al.*, 2003).

Bei der Analyse der Calpain-AS-Zelllinien *capn1AS* und *capn2AS* zeigte sich eine Verringerung der MMP-2-Expression und -Freisetzung ausschließlich bei CP2-verminderten Zellen (Abbildung D.52). Außerdem änderte sich die MMP-2-Verteilung von einer Membranlokalisation bei *mock*- und *capn1AS*-Zellen zu einer diffusen Verteilung mit nur geringer Immunreaktivität von (Pro)MMP-2 bei *capn2AS*-Zellen (Abbildung D.53). Die Calpain-isoformspezifische Lokalisation und Freisetzung von (Pro)MMP-2 wurde in einem pRNAi-Ansatz bestätigt und erweitert, wobei neben *capn2RNAi*-Zellen auch *capn1/capn4RNAi*-sowie *capn2/capn4RNAi*-Zellen eine verminderte MMP-2-Freisetzung zeigten (Abbildung D.54). Dies verdeutlichte die ebenfalls wichtige Rolle der kleinen Untereinheit CP4 von Calpainen bei der MMP-2-Freisetzung.

Da die transkriptionelle Regulation von MMP-2 und MMP-9 durch den ERK/MAPK-Signalweg in der Literatur ausführlich beschrieben ist (CHUNG *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2003; STERNLICHT & WERB, 2001), lag es nun nahe zu überprüfen, ob dieser Signalweg auch in unserem Zellsystem bei der Calpain-isoformabhängigen MMP-Expression eine Rolle spielt. Die erste Analyse dieses Signalweges in den Calpain-AS-Zelllinien zeigte eine Beeinträchtigung der Signalweiterleitung bei *capn2AS*-Zellen, die bereits oberhalb von MEK1/2 stattgefunden haben musste (Abbildung D.56). Zur Bestätigung der Relevanz dieses Ergebnisses für die Expression von MMP-2 wurde in nicht-transfizierten HeLa-Zellen mittels eines spezifischen MEK1/2-Inhibitors die Phosphorylierungskaskade gehemmt, wodurch auch die potentielle gelatinolytische Aktivität von ProMMP-2 zeitabhängig verringert werden konnte (Abbildung D.57). Da in unseren Calpain-AS-Zelllinien ebenso wie bei CP4-defizienten Fibroblasten (ARTHUR *et al.*, 2000) keine Beeinflussung der *de novo* ERK1/2-Expression nachzuweisen war, muß wiederum auf einen indirekten Effekt von Calpainen auf die ERK/MAPK-Signalkaskade geschlossen werden.

Der ERK/MAPK-Signalweg ist mit Membranstrukturen eng verknüpft, wobei sowohl Wachstumsfaktorenrezeptor- als auch Integrin-vermittelte Signale alleine oder in Kombination die Ras/Raf/ERK-Phosphorylierungskaskade induzieren können (CHAKRABORTY *et al.*, 2002). Unsere Analyse des Adaptorproteins Grb2 und der GTPase Ras ergab ein verringertes Proteinniveau sowie eine Verminderung der Phosphorylierung von FAK an Tyr<sup>925</sup> in der Membranfraktion von Vitronektin-stimulierten *capn2AS*-Zellen (Abbildung D. 58). Die Phosphorylierung von FAK an Tyr<sup>925</sup> generiert normalerweise die Bildungsstelle für SH2/SH3-Adaptorproteine wie Grb2. Die von uns beobachtete Beeinträchtigung der Proteininteraktion könnte eine Verminderung der ERK-Phosphorylierung zur Folge haben. Die Bedeutung die-



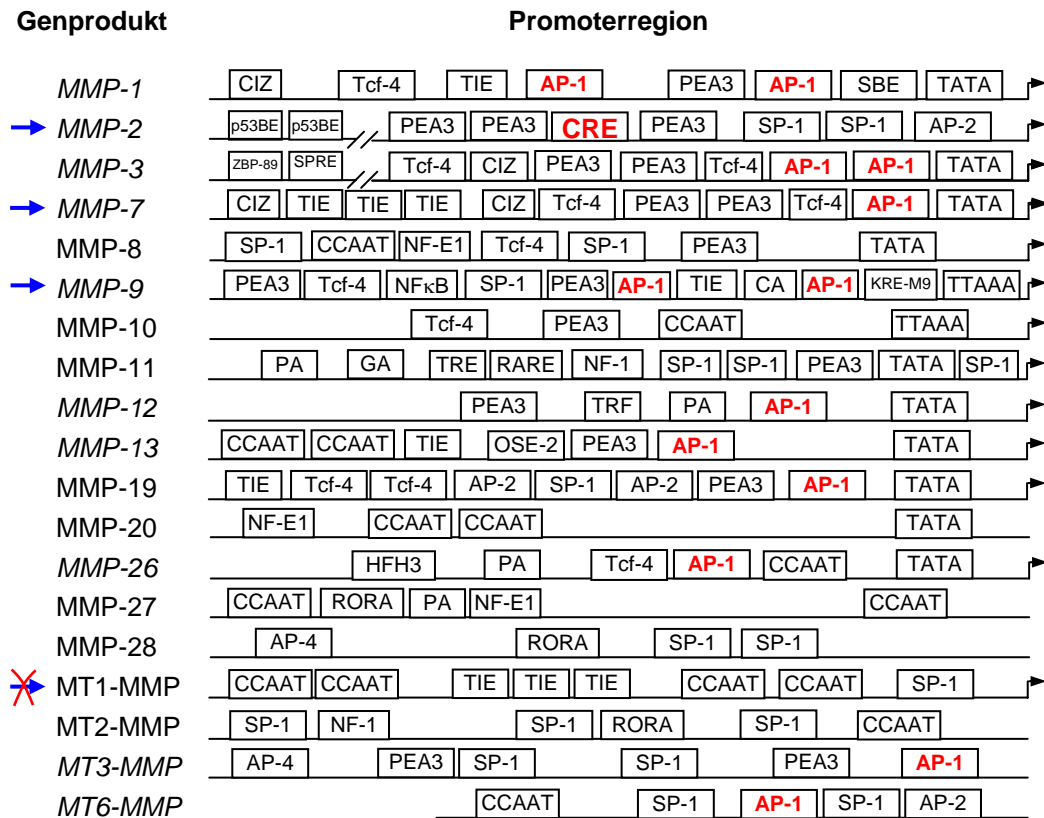
ser Reaktion wird jedoch kontrovers diskutiert, da dominant-negative Inhibitoren von Ras die transiente Integrin-vermittelte Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs in einem Zellmodell nicht verhindern konnten. Darüber hinaus wurde nur eine geringe Korrelation zwischen der EGF-induzierten Akkumulation von GTP-gebundenem Ras und der Zelladhäsion festgestellt (CHEN *et al.*, 1996).

Obwohl in mehreren Studien die Spaltung von PKC $\alpha$  durch Calpain nachgewiesen wurde (GOUDENEGE *et al.*, 2005; SHEA *et al.*, 1994), konnte in unseren Experimenten keine Veränderung der Proteinmenge von PKC $\alpha$  in den Calpain-AS-Zelllinien gegenüber der *mock*-Kontrolle detektiert werden. Jedoch zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der Vitronektin-stimulierten Phosphorylierung von PKC (Abbildung D.59), insbesondere von PKC $\alpha$  (Abbildung D.60). In *in vitro*-Studien wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die Proteolyse von PKC $\alpha$  durch mCP untersucht (LANG *et al.*, 1995). Dabei konnte ein inhibierender Effekt festgestellt werden, der nicht die proteolytische Aktivität von mCP, sondern vielmehr die Konformation von PKC $\alpha$  beeinflusst. Die Autoren postulierten einen Mechanismus, der die Calpain-vermittelte Hydrolyse von PKC $\alpha$  an der Zellmembran minimiert, wobei die Membranlokalisierung eine Interaktion von PKC $\alpha$  mit Integrinen vermuten lässt. Kürzlich konnte die Aktivierung von PKC $\alpha$  durch Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gezeigt werden, die in einer Phosphorylierung von ERK1/2 resultierte. Durch den Einsatz von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelatoren wurde die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit dieses Mechanismus bestätigt (RUCCI *et al.*, 2005). In weiteren zellbasierten Studien an primären Astrozyten wurde zudem die Aktivierung von PKC-Mitgliedern mittels PMA sowie die resultierende Erhöhung einer ERK1/2-Phosphorylierung und MMP-9-Expression nachgewiesen (LEE *et al.*, 2003).

Der ERK/MAPK-Signalweg gilt als möglicher Aktivator des Transkriptionsfaktors CREB und des nachgeordneten AP-1 (QIAO *et al.*, 2003). Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulationselemente bei der Expression vieler MMPs (MARCHENKO *et al.*, 2002). In der Abbildung E.2 sind die Promoterregionen mit den entsprechenden Regulationselementen der MMPs dargestellt. Dabei ist auffallend, dass die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 bei vielen MMP-Promotoren, jedoch nicht bei MMP-2, -8, -10, -11, -20, -27, -28, MT1-MMP und MT2-MMP, vorkommt. In der Promoterregion von MMP-2 ist dagegen die Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor CREB lokalisiert. Die Relevanz des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der transkriptionellen Regulation von MMPs in der transformierten Mammakarzinomzelllinie MDA-231 zeigte die Überexpression von c-Jun und c-fos, deren Hetero- oder Homodimerisierung zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt, wobei die Expression von MMP-3 und MMP-9 erhöht war (BACHMEIER *et al.*, 2005).

Obwohl Calpain in der Lage ist, die einzelnen Mitglieder der c-fos-Familie zu spalten (HIRAI *et al.*, 1991), ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von AP-1-Proteinen und der Calpain-Aktivität jedoch nicht bekannt.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Calpain-vermittelten transkriptionellen MMP-Regulation. Von entscheidender Bedeutung scheint dabei eine m-Calpain-regulierte Induzierung des ERK/MAPK/CREB-Signalweges und die Transkription CRE-regulierter Genprodukte wie z. B. MMP-2 und c-fos zu sein. Als sekundärer transkriptioneller MMP-Regulationsmechanismus könnte nach unseren Daten und in der Literatur beschriebenen Resultaten die potentielle Expression von MMPs unter der Kontrolle von AP-1 (z. B. MMP-7 und MMP-9) stehen.



**Abbildung E.2 Regulationselemente in den MMP-Promoterregionen**

[modifiziert und erweitert nach Marchenko et al. (MARCHENKO et al., 2002)].

In der schematischen Darstellung sind die putativen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren etwa 1 kb oberhalb der Transkriptionsinitiationsseiten dargestellt (die verfügbare Sequenz von MT6-MMP ist kürzer). Die Transkriptionsinitiationsseiten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, außer bei MMP-20, -27, -28, MT2-MMP, MT3-MMP und MT6-MMP, bei denen diese noch nicht identifiziert wurden. Die potentiell durch mCP-regulierten Transkriptionsfaktor-Bindungselemente CRE und AP-1 sind rot gekennzeichnet. Alle MMP-Promoterregionen mit entsprechenden Erkennungssequenzen sind kursiv geschrieben. Die in dieser Arbeit untersuchten MMP-Isoenzyme MMP-2, MMP-7 (cDNA-Array) und MMP-9 sind mit einem blauen Pfeil markiert. In Korrelation zu der Calpain-Inhibitor-unabhängigen Expression von MT1-MMP sind keine CREB- und AP-1-Bindungsstellen im MT1-MMP Promoter (rotes Kreuz) vorhanden.

Für detaillierte Erklärung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Die Komplexität von MMP-Regulationsmechanismen, bei denen funktionelle und transkriptionelle Elemente verknüpft werden, bestätigt sich in den Ergebnissen einer weiteren Arbeitsgruppe. Dabei konnte die durch das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH)-induzierte Expression von MMP-2- und -9 eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors vermitteln, und die GnRH-Induktion von Src, Ras, ERK und c-fos war ebenfalls Gelatinase-abhängig (ROELLE et al., 2003). Diese Beobachtungen in Verbindung mit unseren Resultaten, weisen auf potentielle *feedback*-Mechanismen hin, die eine Feinregulation der Calpain-vermittelten Expression von MMP-2 (HeLa-, THP-1-Zellen) und MMP-9 (THP-1-Zellen) ermöglichen würden.

Unsere Ergebnisse unterstützen zudem die Hypothese eines Integrin-induzierten Regulationsmechanismus der MMP-Transkription. Dabei scheint die Aktivierung des Ras/Raf/ERK-Signalweges die Expression von MMP-2 über CRE und nachgeordnet die von MMP-9 und MMP-7 über AP-1 zu vermitteln. Die Relevanz unserer Ergebnisse wird durch die Tatsachen bekräftigt, dass die EGF-induzierte Aktivierung von m-Calpain (GLADING et al., 2000) und eine mögliche Aktivierung von AP-1 über die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ /EGFR-Interaktion bei der Osteopontin-stimulierten Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (DAS et al., 2004) für potentielle Degradierungen von Zell-Substrat-Kontakten verantwortlich gemacht werden könnten.

### E.5 *Inside-out* → *outside-in*-Regulierung bei der Talin *head*-vermittelten Integrin-Aktivierung und MMP-Transkription

Integrin-vermittelte Signale können in Zellen Prozesse wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose induzieren (VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001). Viele der zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei nicht eindeutig voneinander trennbar, und die beteiligten Signalmoleküle sind oft an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt.

Ein wichtiges Schlüsselprotein bei der Integrin-vermittelten Signalweiterleitung in das Zellinnere ist FAK (DUNTY *et al.*, 2004; SCHALLER *et al.*, 1993; LIPFERT *et al.*, 1992). FAK wurde für die Zellmigration und -invasion als wesentlicher Bestandteil identifiziert (SCHLAEPFER & MITRA, 2004), wobei dessen Aktivität maßgeblich durch die Assoziation mit dem Strukturprotein Talin reguliert wird (CHEN *et al.*, 1995). Im aktiven Zustand ist FAK in der Lage, durch die Rekrutierung von weiteren Signalproteinen unter anderem die Transkription von Migrations- und Invasions-fördernden Genen zu induzieren. Darüber hinaus wird der PYK2, einer weiteren wichtigen Kinase in den fokalen Adhäsionen, eine ähnlich bedeutende Rolle bei der Integrin-vermittelten und PKC-abhängigen Expression von MMP-13 zugeschrieben (LOESER *et al.*, 2003).

Nach den eigenen und den uns vorliegenden Ergebnissen anderer Gruppen schlagen wir für die Beteiligung der konventionellen Calpaine  $\mu$ CP und mCP bei der Zellmigration das folgende „*inside-out* → *outside-in*-Regulationsmodell“ vor (Abbildung E.3).

Bei diesem Modell wird das Strukturprotein Talin (im Zytosol lokalisiert oder unstrukturiert mit geringer Affinität an Membranfaktoren gebunden) von mCP gespalten und so der FERM-Domänen tragende Talin *head* freigesetzt. (*Schritt 1*). Die F3-Subdomäne von FERM interagiert mit dem zytoplasmatischen NPx(Y/F)-Motiv der Integrin  $\beta$ -Untereinheit und induziert die aktive Konformation von Integrinen (CALDERWOOD *et al.*, 2002). Das ebenfalls durch mCP-generierte Spaltprodukt von Ezrin assoziiert mit diesen frühen initialen Kontaktkomplexen der Zelle (GLADING *et al.*, 2002) (*Schritt 2*). Aktivierte Integrine sind nun in der Lage, durch die Assoziation mit ECM-Proteinen an der extrazellulären Bindungsstelle sowie mit intrazellulären Strukturproteinen für die Ausbildung erster Zell-Substrat-Kontakte in fokalen Adhäsionskomplexen zu sorgen (*Schritt 3*). Dabei scheint die indirekte Aktivierung der kleinen GTPase RhoA durch  $\mu$ CP (*Schritt 4*) für die Ausbildung des filamentösen F-Aktin-Netzwerks (F-Aktin-Stressfasern) verantwortlich zu sein (*Schritt 5*). Nachfolgend assoziieren mehrere aktivierte Integrine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (WFR) (SCHLAEPFER & MITRA, 2004) und bilden fest mit dem Substrat verknüpfte fokale Adhäsionen (*Schritt 6*). Diese wiederum rekrutieren eine Vielzahl von Signalmolekülen, unter anderem FAK und PKC $\alpha$  als wichtige Schlüsselproteine. Durch die Interaktion mit Grb2 oder direkt über PKC $\alpha$  wird die ERK-Phosphorylierungskaskade initiiert (*Schritt 7*). Diese Aktivierung von ERK1/2 führt über die Aktivierung von CREB zur Transkription von diversen Genprodukten, unter anderem von MMP-2 und c-fos. Durch die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 aus fos- und Jun-Proteinen wird die Transkription von MMP-7 und MMP-9 induziert (*Schritt 8*). Nun werden die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in ihrer Proform in sekretorischen Vesikeln zur Zellmembran transportiert und dort freigesetzt (*Schritt 9*). Abschließend werden die Integrin-vermittelten Zell-Substrat-Kontakte durch mCP intrazellulär und durch MMPs, hauptsächlich MMP-2 (assoziiert mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  oder in freier Form) extrazellulär proteolytisch degradiert (*Schritt 10*).

In diesem Modell wird m-Calpain eine wichtige Rolle bei der Bildung und Auflösung von Integrin-vermittelten Zell-Substrat-Kontakten zugeschrieben, während  $\mu$ -Calpain wahrscheinlich mehr die dynamische Organisation des Aktin-Zytoskeletts koordiniert.

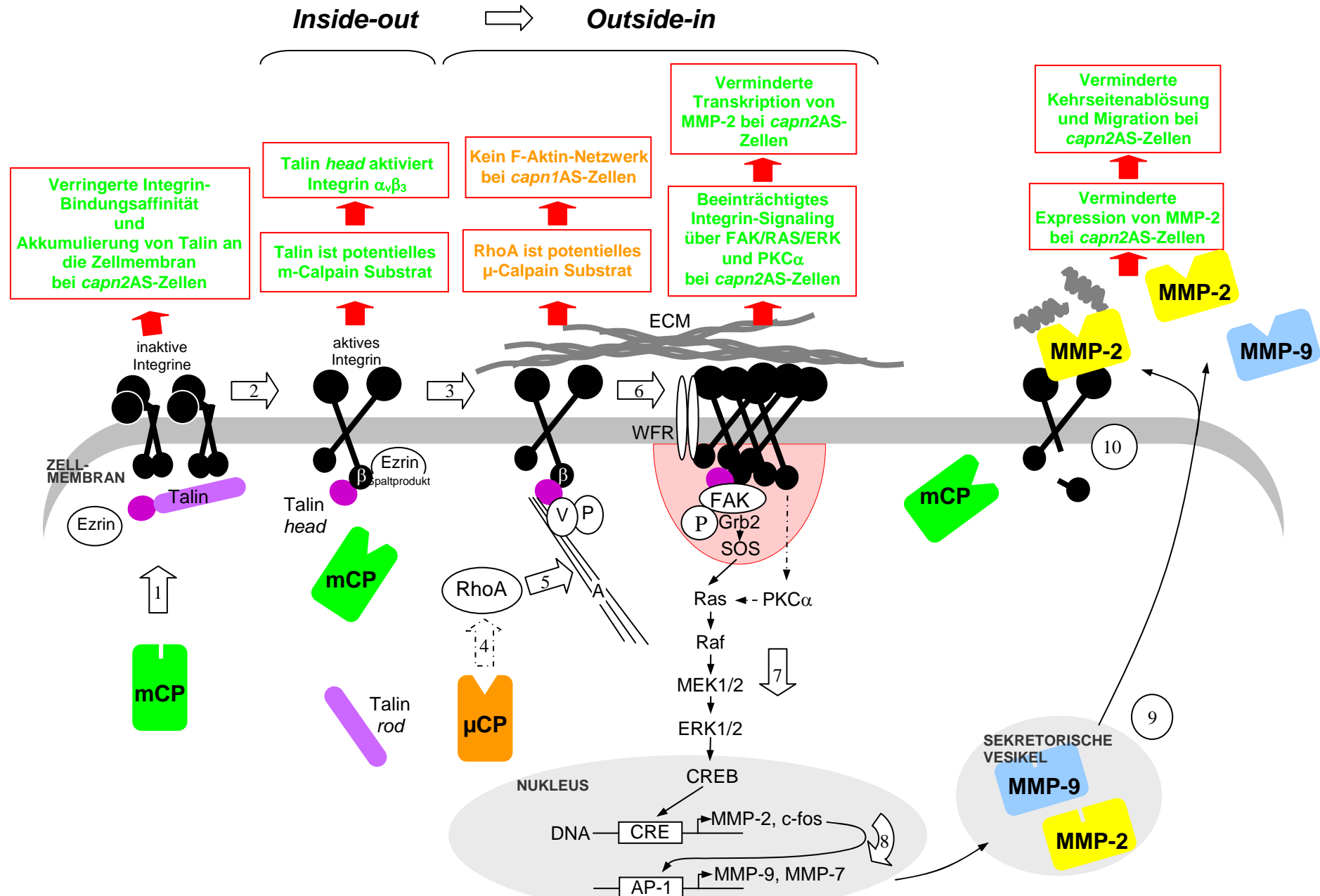


Abbildung E.3 „Inside-out → outside-in-Regulationsmodell“

V, Vinculin; P, Paxilin; A, F-Aktin-Stressfasern; gestrichelte Pfeile, hypothetische und/oder indirekte Interaktionen. Weitere Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis und Text.

## E.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich unterschiedliche Beteiligungen der Calpain-Isoformen  $\mu$ CP und mCP bei zellulären Prozessen wie der Migration, der Zellzyklusprogression und der Apoptoseinduktion. Calpain-AS- und RNAi-Strategien konnten effektiv die Expression der Calpaine vermindern und die Etablierung wertvoller Modelle für die Untersuchung der oben beschriebenen Mechanismen ermöglichen.

Durch die Transkriptanalyse von diversen Genprodukten in Calpain-verminderten AS-Zellen konnte eine Vielzahl Calpain-isoformspezifisch beeinflusster (*up*- und/oder *down*-Regulation) Transkripte von Signal-, Struktur- bzw. Adhäsionsmolekülen identifiziert werden. Diese Genprodukte stellen in Verbindung mit der Calpain-Aktivität wichtige *target*-Moleküle für die Erforschung von Calpainen als Mediatoren bei zahlreichen zellulären Funktionen dar.

So konnte  $\mu$ CP als positiver Regulator der Proliferation subkonfluenten Zellen identifiziert werden. Die durch die  $\mu$ CP-Verminderung ausgelöste Zellzyklusarretierung in der G1/G0-Phase und die erhöhte Apoptoseneigung korrelierten dabei mit der Persistenz von Cyclin D1, der Abwesenheit von Cyclin D2, einem verminderten Proteinlevel von CDK4 und einer reduzierten Expression des hyperphosphorylierten Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins.

Auf der anderen Seite konnte mCP über die spezifische Spaltung von Talin als potentieller Regulator der Kehrseitenablösung migrierender Zellen identifiziert werden. Die Aufklärung der Röntgenkristallstrukturen von Talin und insbesondere von aktivem  $\mu$ CP und mCP könnten weitere wichtige Hinweise für die Substratspezifität der Calpain-Isoformen liefern.

Darüber hinaus vermitteln unsere Ergebnisse ein besseres Verständnis der Calpain-Beteiligung an Regulationsmechanismen der Expression von MMPs, insbesondere von MMP-2 bei HeLa-Tumorzellen. Wir konnten eindeutig zeigen, dass mCP den ERK/MAPK-Signalweg positiv reguliert und das Transkriptniveau von *c-fos* in CP2-verminderten Zellen reduziert ist. Die geringere MMP-2-Expression und die Beeinträchtigung der MEK1/2-ERK1/2-Phosphorylierungskaskade korrelierten dabei mit der verminderten Lokalisation des SH2-SH3-Adaptorproteins Grb2 an der Zytoplasmamembran und der Vitronektin-stimulierten Phosphorylierung von PKC $\alpha$ . Ob ein derartiger Zusammenhang auch bei anderen Tumorzellen zu finden ist, bedarf jedoch zusätzlicher Untersuchungen.

Im Hinblick auf die prominente Rolle von konventionellen Calpainen vor allem bei Zellmigrationsprozessen könnten zur weiteren Aufklärung der Beteiligung von  $\mu$ CP und mCP an den zugrunde liegenden Mechanismen folgende Experimente dienen:

- *in situ* Metastasierungsmodelle mit entsprechender Etablierung von CP-Isoform- und Talin-defizienten Zellen durch siRNA-Konstrukte mittels lentiviraler Transduktionstechniken;
- Promoterstudien von entsprechenden MMP-Genen in Verbindung mit regulierbarer Calpain-Aktivität in Zellmodellen;
- Integrin-Aktivierungsstudien in Verbindung mit den hergestellten Talin-Varianten und -Mutanten in Integrin  $\alpha_v\beta_3$  überexprimierenden oder *knock out*-Zellen;
- Protein-Protein-Interaktionsstudien vom Calpain bzw. einer hydrolyseinaktiven mCP-Mutante (Cys<sup>105</sup>Ala) mit entsprechenden Proteinen durch Immunopräzipitation und FRET (*fluorescence resonance energy transfer*);
- Echtzeit-Analysen der Calpain-Expression und -Aktivität sowie interessanter Substrate (Talin, Grb2, PKC $\alpha$ , RhoA, Cdc42) in migrierenden Zellen.

Mit Hilfe dieser Experimente ließen sich sicher auch weitere Einblicke in die Prozesse der Zellzyklusregulierung und Apoptoseinduktion gewinnen.

## F Literaturverzeichnis

- Alevriadou B. R. (2003). CAMs and Rho small GTPases: gatekeepers for leukocyte transendothelial migration. Focus on "VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration". *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285** (2): C250-C252.
- Alexiou D., Karayiannakis A. J., Syrigos K. N., Zbar A., Sekara E., Michail P., Rosenberg T., Diamantis T. (2003). Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am. J. Gastroenterol.* **98** (2): 478-485.
- Allen F. D., Asnes C. F., Chang P., Elson E. L., Lauffenburger D. A., Wells A. (2002). Epidermal growth factor induces acute matrix contraction and subsequent calpain-modulated relaxation. *Wound Repair Regen.* **10** (1): 67-76.
- Andrews B. J., Proteau G. A., Beatty L. G., Sadowski P. D. (1985). The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell.* **40** (4): 795-803.
- Arthur J. S., Crawford C. (1996). Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1293** (2): 201-206.
- Arthur J. S., Elce J. S., Hegadorn C., Williams K., Greer P. A. (2000). Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol. Cell. Biol.* **20** (12): 4474-4481.
- Arthur W. T., Noren N. K., Burridge K. (2002). Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol. Res.* **35** (2): 239-46.
- Auwerx, J. (1991). The human leukaemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* **47**: 22-31.
- Azam M., Andrabi S. S., Sahr K. E., Kamath L., Kuliopulos A., Chishti A. H. (2001). Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell. Biol.* **21** (6): 2213-2220.
- Bachmeier B. E., Albini A., Vene R., Benelli R., Noonan D., Weigert C., Weiler C., Lichtinghagen R., Jochum M., Nerlich A. G. (2005). Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* **305** (1): 83-98.
- Barker N., Morin P. J., Clevers H. (2000). The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv. Cancer Res.* **77**: 1-24.
- Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnar O., Friedrich P. (1996). Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem. J.* **318** ( Pt 3): 897-901.

- Bauer S. M., Bauer R. J., Liu Z. J., Chen H., Goldstein L., Velazquez O. C. (2005). Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *J. Vasc. Surg.* **41** (4): 699-707.
- Bellanger J.M., Astier C., Sardet C., Ohta Y., Stossel T. P., Debant A. (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat. Cell. Biol.* **2** (12): 888-892.
- Benbow U., Brinckerhoff C. E. (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol.* **15** (8-9): 519-526.
- Bhardwaj A., Aggarwal B. B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol.* **23** (5): 317-332.
- Birnboim H. C, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
- Boger D. L., Goldberg J., Silletti S., Kessler T., Cheresch D. A. (2001). Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP2 to integrin alpha(V)beta(3). *J. Am. Chem. Soc.* **123** (7): 1280-1288.
- Borgono C. A., Diamandis E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **4** (11): 876-890.
- Borowsky M. L., Hynes R. O. (1998). Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J. Cell. Biol.* **143** (2): 429-442.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274** (31): 21953-21962.
- Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fassler R. (2002). Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.* **109** (8): 999-1006.
- Brigstock D. R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *J. Endocrinol.* **178** (2): 169-175.
- Brooks P. C., Stromblad S., Sanders L. C., von Schalscha T. L., Aimes R. T., Stetler-Stevenson W. G., Quigley J. P., Cheresch D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* **85** (5): 683-693.
- Buck C. A., Horwitz A. F. (1987). Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **3**: 179-205.
- Butt A. J., Dickson K. A., Jambazov S., Baxter R. C. (2005). Enhancement of tumor necrosis factor-alpha-induced growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5), but not IGFBP-3 in human breast cancer cells. *Endocrinology.* **146** (7): 3113-3122.

- Caceres M., Guerrero J., Martinez J. (2005). Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* [Epub ahead of print]
- Calderwood D. A., Yan B., de Pereda J. M., Alvarez B. G., Fujioka Y., Liddington R. C., Ginsberg M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J. Biol. Chem.* **277** (24): 21749-21758.
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J., Hynes, R. O. and Ginsberg, M. H. (1999). The talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J. Biol. Chem.* **274** (40): 28071-28074.
- Cao J., Rehemtulla A., Pavlaki M., Kozarekar P., Chiarelli C. (2005). Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-Golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. *J. Biol. Chem.* **280** (12): 10974-10980.
- Canter R. J., Kesmodel S. B., Heitjan D. F., Veeramachaneni N. K., Mokadam N. A., Drebin J. A., Fraker D. L. (2005). Suppression of beta-Catenin by Antisense Oligomers Augments Tumor Response to Isolated Limb Perfusion in a Rodent Model of Adenomatous Polyposis Coli-Mutant Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* [Epub ahead of print]
- Carragher N. O., Frame M. C. (2003). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell. Biol.* **14** (5): 241-249.
- Carillo S., Pariat M., Steff A. M., Roux P., Etienne-Julan M., Lorca T., Piechaczyk M. (1994). Differential sensitivity of FOS and JUN family members to calpains. *Oncogene*. **9** (6): 1679-1689.
- Celis, J. E. (1994). Cell Biology: A Laboratory Handbook. Toronto. Academic Press.
- Chakraborty C., Gleeson L. M., McKinnon T., Lala P. K. (2002). Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80** (2): 116-124.
- Chatterjee P. K., Todorovic Z., Sivarajah A., Mota-Filipe H., Brown P. A., Stewart K. N., Mazzone E., Cuzzocrea S., Thiemermann C. (2005). Inhibitors of calpain activation (PD150606 and E-64) and renal ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Pharmacol.* **69** (7): 1121-1131.
- Chen H. C., Appeddu P. A., Parsons J. T., Hildebrand J. D., Schaller M. D., Guan J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J. Biol. Chem.* **270** (28): 16995-16999.
- Chen Z., Knutson E., Kurosky A., Albrecht T. (2001). Degradation of p21cip1 in cells productively infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.* **75** (8): 3613-3625.
- Chen Q., Lin T. H., Der C. J., Juliano R. L. (1996). Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras [corrected]. *J. Biol. Chem.* **271** (30): 18122-18127.



- Chen Y. P., O'Toole T. E., Shipley T., Forsyth J., LaFlamme S. E., Yamada K. M., Shattil S. J., Ginsberg M. H. (1994). "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **269** (28): 18307-18310.
- Chinje E. C., Stratford I. J. (1997). Role of nitric oxide in growth of solid tumours: a balancing act. *Essays Biochem.* **32**: 61-72.
- Chipuk J. E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N. M., Newmeyer D. D., Schuler M., Green D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. **303** (5660): 1010-1014.
- Christerson L. B., Vanderbilt C. A., Cobb M. H. (1999). MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. **43** (3): 186-198.
- Chung T. W., Lee Y. C., Kim C. H. (2004). Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J.* **18** (10): 1123-1125.
- Ciborowski P., Enose Y., Mack A., Fladseth M., Gendelman H. E. (2004). Diminished matrix metalloproteinase 9 secretion in human immunodeficiency virus-infected mononuclear phagocytes: modulation of innate immunity and implications for neurological disease. *J. Neuroimmunol.* **157** (1-2): 11-16.
- Crawford C. (1987). Inhibition of chicken calpain II by proteins of the cystatin superfamily and alpha 2-macroglobulin. *Biochem. J.* **248** (2): 589-594.
- Crawford A. W., Michelsen J. W., Beckerle M. C. (1992). An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J. Cell. Biol.* **116** (6): 1381-1393.
- Crooke S. T. (2004). Antisense strategies. *Curr. Mol. Med.* **4** (5): 465-487.
- Cuff J. A., Clamp M. E., Siddiqui A. S., Finlay M., Barton G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics*. **14** (10): 892-893.
- Cuerrier D., Moldoveanu T., Davies P. L. (2005). Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. *J. Biol. Chem.* **280** (49): 40632-40641.
- Czuchra A., Wu X., Meyer H., van Hengel J., Schroeder T., Geffers R., Rottner K., Brakebusch C. (2005). Cdc42 Is Not Essential for Filopodium Formation, Directed Migration, Cell Polarization, and Mitosis in Fibroblastoid Cells. *Mol. Biol. Cell.* [Epub ahead of print]
- Das R., Mahabeleshwar G. H., Kundu G. C. (2004). Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **279** (12): 11051-11064.
- Danen E. H., Yamada K. M. (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J. Cell Physiol.* **189** (1): 1-13.

- Danial N. N., Korsmeyer S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*. **116** (2): 205-219.
- Dayton W. R., Goll D. E., Zeece M. G., Robson R. M., Reville W. J. (1976). A  $\text{Ca}^{2+}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*. **15** (10): 2150-2158.
- Dedieu S., Poussard S., Mazeres G., Grise F., Dargelos E., Cottin P., Brustis J. J. (2004). Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell. Res.* **292** (1): 187-200.
- Delmas C., Aragou N., Poussard S., Cottin P., Darbon J. M., Manenti S. (2003). MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. *J. Biol. Chem.* **278** (14): 12443-12451.
- DeMali K. A., Barlow C. A., Burrridge K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell. Biol.* **159** (5): 881-891.
- Deryugina E. I., Bourdon M. A., Jungwirth K., Smith J. W., Strongin A. Y. (2000). Functional activation of integrin  $\alpha$  V  $\beta$  3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Int. J. Cancer*. **86** (1): 15-23.
- Deryugina E. I., Ratnikov B., Monosov E., Postnova T. I., DiScipio R., Smith J. W., Strongin A. Y. (2001). MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* **263** (2): 209-23.
- Dietrich C., Bartsch T., Schanz F., Oesch F., Wieser R. J. (1996). p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **93** (20): 10815-10819.
- Di Paolo G., Pellegrini L., Letinic K., Cestra G., Zoncu R., Voronov S., Chang S., Guo J., Wenk M. R., De Camilli P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1  $\gamma$  by the FERM domain of talin. *Nature*. **420** (6911): 85-89.
- Dormond O., Ponsonnet L., Hasmim M., Foletti A., Ruegg C. (2004). Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of  $\alpha$  V  $\beta$  3 integrin to focal adhesions in endothelial cells: evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src. *Thromb. Haemost.* **92** (1): 151-161.
- Dourdin N., Bhatt A. K., Dutt P., Greer P. A., Arthur J. S., Elce J. S., Huttenlocher A. (2001). Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276** (51): 48382-48388.
- Drexler, H. G., Quentmeier, H., MacLeod, R. A., Uphoff, C. C., and Hu, Z. B. (1995). Leukaemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukaemia. *Leuk. Res.* **19**: 681-691.
- Dunty J. M., Gabarra-Niecko V., King M. L., Ceccarelli D. F., Eck M. J., Schaller M. D. (2004). FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol. Cell. Biol.* **24** (12): 5353-5368.

- Dutt P., Arthur J. S., Croall D. E., Elce J. S. (1998). m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. *FEBS Lett.* **436** (3): 367-371.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H. (1999), Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 383-424.
- Eccles S. A. (2005). Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15** (1): 77-86.
- Elangbam C. S., Qualls C. W. Jr., Dahlgren R. R. (1997). Cell adhesion molecules - update. *Vet. Pathol.* **34** (1): 61-73.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411** (6836): 494-498.
- Elce J. S., Hegadorn C., Arthur J. S. (1997). Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* **272** (17): 11268-11275.
- Emsley J., Knight C. G., Farndale R. W., Barnes M. J., Liddington R. C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* **101** (1): 47-56.
- Eustace, B. K., Jay, D. G. (2005). Functional Proteomics Using Direct Protein Inactivation. *Current Proteomics.* **2** (2): 103-107.
- Fan Y., Zheng S., Xu Z. F., Ding J. Y. (2005). Apoptosis induction with polo-like kinase-1 antisense phosph-oro-thioate oligodeoxynucleotide of colon cancer cell line SW480. *World J. Gastroenterol.* **11** (29): 4596-4599.
- Fanin, M., Nascimbeni, A. C., Fulizio, L., Trevisan, C. P., Meznaric-Petrusa, M., Angelini, C. (2003). Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am. J. Pathol.* **163**: 1929-1936.
- Fernandez-Montalvan A., Assfalg-Machleidt I., Pfeiler D., Fritz H., Jochum M., Machleidt W. (2004). Electrostatic interactions of domain III stabilize the inactive conformation of mu-calpain. *Biochem. J.* **382** (2): 607-617.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391** (6669): 806-811.
- Frame S., Cohen P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359** (1): 1-16.
- Franco S., Perrin B., Huttenlocher A. (2004). Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp. Cell. Res.* **299** (1): 179-187.
- Friedl P., Wolf K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* **3** (5): 362-374.

- Fuentes-Prior P., Salvesen G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* **384** (2): 201-32.
- Gabrijelcic-Geiger D., Mentele R., Meisel B., Hinz H., Assfalg-Machleidt I., Machleidt W., Moller A., Auerswald E. A. (2001). Human micro-calpain: simple isolation from erythrocytes and characterization of autolysis fragments. *Biol. Chem.* **382** (12): 1733-1737.
- Garcia-Alvarez B., de Pereda J. M., Calderwood D. A., Ulmer T. S., Critchley D., Campbell I. D., Ginsberg M. H., Liddington R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol. Cell.* **11** (1): 49-58.
- Genersch E., Hayess K., Neuenfeld Y., Haller H. (2000). Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J. Cell. Sci.* **113** (23): 4319-4330.
- Gershoni J. M., Palade G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131** (1): 1-15.
- Giancotti F. G., Ruoslahti E. (1999). Integrin signaling. *Science*. **285** (5430): 1028-1032.
- Gil-Parrado S., Fernandez-Montalvan A., Assfalg-Machleidt I., Popp O., Bestvater F., Holloschi A., Knoch T. A., Auerswald E. A., Welsh K., Reed J. C., Fritz H., Fuentes-Prior P., Spiess E., Salvesen G. S., Machleidt W. (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* **277** (30): 27217-27226.
- Gil-Parrado S., Popp O., Knoch T. A., Zahler S., Bestvater F., Felgentrager M., Holloschi A., Fernandez-Montalvan A., Auerswald E. A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W., Spiess E. (2003). Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. *J. Biol. Chem.* **278** (18): 16336-16346.
- Ghosh M., Shanker S., Siwanowicz I., Mann K., Machleidt W., Holak T. A. (2005). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by calpain. *Biol. Chem.* **386** (1): 85-93.
- Glading A., Chang P., Lauffenburger D. A., Wells A. (2000). Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **275** (4): 2390-2398.
- Glading A., Lauffenburger D. A., Wells A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* **12** (1): 46-54.
- Goetz F. W., Planas J. V., MacKenzie S. (2004). Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.* **28** (5): 487-497.
- Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W., Cong J. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* **83** (3): 731-801.
- Goldman S., Shalev E. (2006). Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol. Reprod.* **74** (1): 13-22.

- Goldoni M., Azzalin G., Macino G., Cogoni C. (2004). Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **41** (11): 1016-1024.
- Goudenege S., Poussard S., Dulong S., Cottin P. (2005). Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37** (9): 1900-1910.
- Grassi G., Schneider A., Engel S., Racchi G., Kandolf R., Kuhn A. (2005). Hammerhead ribozymes targeted against cyclin E and E2F1 cooperate to down-regulate coronary smooth muscle cell proliferation. *J. Gene Med.* [Epub ahead of print]
- Grzeszkiewicz T. M., Lindner V., Chen N., Lam S. C., Lau L. F. (2002). The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology.* **143** (4): 1441-1450.
- Griscavage J. M., Wilk S., Ignarro L. J. (1995). Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215** (2): 721-729.
- Guroff G. (1964). A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* **239**: 149-155.
- Guttmann R. P., Elce J. S., Bell P. D., Isbell J. C., Johnson G. V. (1997). Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. *J. Biol. Chem.* **272** (3): 2005-2012.
- Haas J., Park E. C., Seed B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6** (3): 315-324.
- Hemmings L., Rees D. J., Ohanian V., Bolton S. J., Gilmore A. P., Patel B., Priddle H., Trevithick J. E., Hynes R. O., Critchley D. R. (1996). Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J. Cell. Sci.* **109** (11): 2715-2726.
- Hendey B., Klee C. B., Maxfield F. R. (1992). Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science.* **258** (5080): 296-299.
- Hendey B., Lawson M., Marcantonio E. E., Maxfield F. R. (1996). Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor identified by antibodies to integrins alphav and beta3. *Blood.* **87** (5): 2038-2048.
- Hendey B., Maxfield F. R. (1993). Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients. *Blood Cells.* **19** (1): 143-161.
- Hendrix M. J., Seftor E. A., Seftor R. E., Fidler I. J. (1987). A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants. *Cancer Lett.* **38** (1-2): 137-147.
- Hiwasa T., Nakata M., Nakata M., Ohno S., Maki M., Suzuki K., Takiguchi M. (2002). Regulation of transformed state by calpastatin via PKCepsilon in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290** (1): 510-517.

- Hirai S., Kawasaki H., Yaniv M., Suzuki K. (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett.* **287** (1-2): 57-61.
- Hohenester E., Engel J. (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **21** (2): 115-128.
- Honda S., Marumoto T., Hirota T., Nitta M., Arima Y., Ogawa M., Saya H. (2004). Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *J. Biol. Chem.* **279** (11): 10615-10623.
- Horwitz A., Duggan K., Buck C., Beckerle M. C., Burridge K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin - a transmembrane linkage. *Nature.* **320** (6062): 531-533.
- Hosfield C. M., Ye Q., Arthur J. S., Hegadorn C., Croall D. E., Elce J. S., Jia Z. (1999). Crystallization and X-ray crystallographic analysis of m-calpain, a Ca<sup>2+</sup>-dependent protease. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **55** (8): 1484-1486.
- Hsu S. C., Gavrilin M. A., Lee H. H., Wu C. C., Han S. H., Lai M. Z. (1999). NF-kappa B-dependent Fas ligand expression. *Eur. J. Immunol.* **29** (9): 2948-2956.
- Huang D., Chen S. W., Gudas L. J. (2002). Analysis of two distinct retinoic acid response elements in the homeobox gene Hoxb1 in transgenic mice. *Dev. Dyn.* **223** (3): 353-370.
- Hubermann, E., Callaham, M. F. (1979). Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukaemia cells by tumor-promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1293-1297.
- Hughes A. R., Putney J. W. Jr. (1988). Metabolism and functions of inositol phosphates. *Biofactors.* **1** (2): 117-121.
- Huttenlocher A., Palecek S. P., Lu Q., Zhang W., Mellgren R. L., Lauffenburger D. A., Ginsberg M. H., Horwitz A. F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* **272** (52): 32719-32722.
- Hynes R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110** (6): 673-687.
- Janossy J., Ubezio P., Apati A., Magocsi M., Tompa P., Friedrich P. (2004). Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. *Biochem. Pharmacol.* **67** (8): 1513-1521.
- Jedeszko C., Sloane B. F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* **385** (11): 1017-1027.
- Jin H., Varner J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer.* **90** (3): 561-565.
- Jinnin M., Ihn H., Mimura Y., Asano Y., Yamane K., Tamaki K. (2005). Matrix metalloproteinase-1 up-regulation by hepatocyte growth factor in human dermal fibroblasts via ERK signaling pathway involves Ets1 and Fli1. *Nucleic Acids Res.* **33** (11): 3540-3549.

- Johansson S., Smedsrod B. (1986). Identification of a plasma gelatinase in preparations of fibronectin. *J. Biol. Chem.* **261** (10): 4363-4366.
- Johnson G. V., Guttman R. P. (1997). Calpains: intact and active? *Bioessays*. **19** (11): 1011-1018.
- Kamphuis I. G., Kalk K. H., Swarte M. B., Drenth J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **179** (2): 233-256.
- Kanai K., Asano K., Hisamitsu T., Suzuki H. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 production from neutrophils by a macrolide antibiotic, roxithromycin, in vitro. *Mediators Inflamm.* **13** (5-6): 313-319.
- Kanomata N., Nakahara R., Oda T., Aoyagi Y., Ishii G., Yokose T., Hasebe T., Nagai K., Yokozaki H., Ochiai A. (2005). Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components. *Mod Pathol.* **18** (6): 828-837.
- Kao W. J. (1999). Evaluation of protein-modulated macrophage behavior on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering. *Biomaterials*. **20** (23-24): 2213-2221.
- Kassis J., Radinsky R., Wells A. (2002). Motility is rate-limiting for invasion of bladder carcinoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **34** (7): 762-775.
- Katano M. (2005). Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Lett.* **227** (2): 99-104.
- Kawada K., Sonoshita M., Sakashita H., Takabayashi A., Yamaoka Y., Manabe T., Inaba K., Minato N., Oshima M., Taketo M. M. (2004). Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res.* **64** (11): 4010-4017.
- Keller R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science*. **298** (5600): 1950-1954.
- Khan Q. A., Dipple A., Anderson L. M. (2002). Protease inhibitor-induced stabilization of p21(waf1/cip1) and cell-cycle arrest in chemical carcinogen-exposed mammary and lung cells. *Mol. Carcinog.* **33** (1): 1-8.
- Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robey P. G., Tryggvason K., Martin G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. **21** (24): 6188-6193.
- Koch A. E. (2005). Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum.* **52** (3): 710-721.
- Kone B. C., Kunczewicz T., Zhang W., Yu Z. Y. (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **285** (2): F178-F190.

- Kozak M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196** (4): 947-950.
- Kozanidou V. I., Theocharis A. D., Georgiadis A., Voulgari P. V., Drosos A. A., Karamanos N. K. (2005). Signal transduction by IL-2 and its receptors as target in treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **5** (1): 41-50.
- Kremer E. A., Chen Y., Suzuki K., Nagase H., Gorski J. P. (1998). Hydroxyapatite induces autolytic degradation and inactivation of matrix metalloproteinase-1 and -3. *J. Bone Miner. Res.* **13** (12): 1890-1902.
- Kucharczak J. F., Simmons M. J., Duckett C. S., Gelinas C. (2005). Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell. Death Differ.* **12** (9): 1225-1239.
- Kulkarni S., Goll D. E., Fox J. E. (2002). Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *J. Biol. Chem.* **277** (27): 24435-24441.
- Kulkarni S., Saido T. C., Suzuki K., Fox J. E. (1999). Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J. Biol. Chem.* **274** (30): 21265-21275.
- Kwei K. A., Finch J. S., Ranger-Moore J., Bowden G. T. (2005). The role of Rac1 in maintaining malignant phenotype of mouse skin tumor cells. *Cancer Lett.* [Epub ahead of print]
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** (5259): 680-685.
- Lang D., Beermann M. L., Hauser G., Cressman C. M., Shea T. B. (1995). Phospholipids inhibit proteolysis of protein kinase C alpha by mM calcium-requiring calpain. *Neurochem. Res.* **20** (11): 1361-1364.
- Lawson M. A., Maxfield F. R. (1995). Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature.* **377** (6544): 75-79.
- Lee J. W., Juliano R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells.* **17** (2): 188-202.
- Lee W. J., Shin C. Y., Yoo B. K., Ryu J. R., Choi E. Y., Cheong J. H., Ryu J. H., Ko K. H. (2003). Induction of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in lipopolysaccharide-stimulated primary astrocytes is mediated by extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (Erk1/2). *Glia.* **41** (1): 15-24.
- Leinweber B. D., Leavis P. C., Grabarek Z., Wang C. L., Morgan K. G. (1999). Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem. J.* **344** (Pt 1): 117-23.
- Li M., Sakaguchi D. S. (2002). Expression patterns of focal adhesion associated proteins in the developing retina. *Dev. Dyn.* **225** (4): 544-553.



- Lindbo J. A., Dougherty W. G. (2004). Plant Pathology and RNAi: A Brief History. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12**
- Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur. Elsevier.
- Lindstad R. I., Sylte I., Mikalsen S. O., Seglen P. O., Berg E., Winberg J. O. (2005). Pancreatic trypsin activates human promatrix metalloproteinase-2. *J. Mol. Biol.* **350** (4): 682-698.
- Lipfert L., Haimovich B., Schaller M. D., Cobb B. S., Parsons J. T., Brugge J. S. (1992). Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell. Biol.* **119** (4): 905-912.
- Liu C., Hermann T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253** (17): 5892-5894.
- Loeser R. F. (2000). Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology.* **37** (1-2): 109-116.
- Loeser R. F., Forsyth C. B., Samarel A. M., Im H. J. (2003). Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **278** (27): 24577-24585.
- Lokuta M. A., Nuzzi P. A., Huttenlocher A. (2003). Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100** (7): 4006-4011.
- Loo D. T., Kanner S. B., Aruffo A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J. Biol. Chem.* **273** (36): 23304-23312.
- Ludewig B., Laman J. D. (2004). The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101** (32): 11529-11530.
- Luo D., Mari B., Stoll I., Anglard P. (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* **277** (28): 25527-25536.
- Maenpaa A., Kovanen P. E., Paetau A., Jaaskelainen J., Timonen T. (1997). Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl).* **94** (3): 216-225.
- Maki M., Takano E., Mori H., Sato A., Murachi T., Hatanaka M. (1987). All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett.* **223** (1): 174-180.
- Makis A. C., Hatzimichael E. C., Mavridis A., Bourantas K. L. (2000). Alpha-2-macroglobulin and interleukin-6 levels in steady-state sickle cell disease patients. *Acta Haematol.* **104** (4): 164-168.

- Mamoune A., Luo J. H., Lauffenburger D. A., Wells A. (2003). Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res.* **63** (15): 4632-4640.
- March K. L., Wilensky R. L., Roeske R. W., Hathaway D. R. (1993). Effects of thiol protease inhibitors on cell cycle and proliferation of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.* **72** (2): 413-423.
- Marchenko G. N., Marchenko N. D., Leng J., Strongin A. Y. (2002). Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem. J.* **363** (2): 253-262.
- Marconi A., Atzei P., Panza C., Fila C., Tiberio R., Truzzi F., Wachter T., Leverkus M., Pincelli C. (2004). FLICE/caspase-8 activation triggers anoikis induced by beta1-integrin blockade in human keratinocytes. *J. Cell. Sci.* **117** (24): 5815-5823.
- Marie N., Lindsay A. J., McCaffrey M. W. (2005). Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochem. J.* **389** (1): 223-231.
- Martel V., Racaud-Sultan C., Dupe S., Marie C., Paulhe F., Galmiche A., Block M. R., Albiges-Rizo C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **276** (24): 21217-21227.
- Marti A., Luo Z., Cunningham C., Ohta Y., Hartwig J., Stossel T. P., Kyriakis J. M., Avruch J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **272** (5): 2620-2628.
- Martinez-Ceballos E., Chambon P., Gudas L. J. (2005). Differences in gene expression between wild type and Hoxa1 knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal. *J. Biol. Chem.* **280** (16): 16484-16498.
- Matt N., Schmidt C. K., Dupe V., Dennefeld C., Nau H., Chambon P., Mark M., Ghyselinck N. B. (2005). Contribution of cellular retinol-binding protein type 1 to retinol metabolism during mouse development. *Dev. Dyn.* **233** (1): 167-176.
- McGuffin L. J., Bryson K., Jones D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* **16** (4): 404-405.
- Mellgren R. L. (1997). Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236** (3): 555-558.
- Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B., Pontremoli S. (1998). Mechanism of action of a new component of the Ca(2+)-dependent proteolytic system in rat brain: the calpain activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249** (3): 583-588.
- Miao H., Strebhardt K., Pasquale E. B., Shen T. L., Guan J. L., Wang B. (2005). Inhibition of integrin-mediated cell adhesion but not directional cell migration requires catalytic activity of EphB3 receptor tyrosine kinase. Role of Rho family small GTPases. *J. Biol. Chem.* **280** (2): 923-932.

- Michetti M., Viotti P. L., Melloni E., Pontremoli S. (1991). Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **202** (3): 1177-1180.
- Misugi F., Sumi T., Okamoto E., Nobeyama H., Hattori K., Yoshida H., Matsumoto Y., Yasui T., Honda K., Ishiko O. (2005). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in uterine endometrial carcinoma and a correlation between expression of matrix metalloproteinase-7 and prognosis. *Int. J. Mol. Med.* **16** (4): 541-546.
- Miyagishi M., Taira K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **20** (5): 497-500.
- Miyagishi M., Taira K. (2004). RNAi expression vectors in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* **252**: 483-491.
- Moldoveanu T., Hosfield C. M., Lim D., Elce J. S., Jia Z., Davies P.L. (2002). A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108** (5): 649-60.
- Momeni H. R., Kanje M. (2005). The calpain inhibitor VI prevents apoptosis of adult motor neurons. *Neuroreport.* **16** (10): 1065-1068.
- Monkley S. J., Zhou X. H., Kinston S. J., Giblett S. M., Hemmings L., Priddle H., Brown J. E., Pritchard C. A., Critchley D. R., Fassler R. (2000). Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev. Dyn.* **219** (4): 560-574.
- Mott J. D., Werb Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **16** (5): 558-564.
- Moyano J. V., Maqueda A., Casanova B., Garcia-Pardo A. (2003). Alpha4beta1 integrin/ligand interaction inhibits alpha5beta1-induced stress fibers and focal adhesions via down-regulation of RhoA and induces melanoma cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **14** (9): 3699-3715.
- Mukai H., Toshimori M., Shibata H., Takanaga H., Kitagawa M., Miyahara M., Shimakawa M., Ono Y. (1997). Interaction of PKN with alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* **272** (8): 4740-4746.
- Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M., Murakami T. (1980). Intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv. Enzyme. Regul.* **19**: 407-424.
- Murray D., Morrin M., McDonnell S. (2004). Increased invasion and expression of MMP-9 in human colorectal cell lines by a CD44-dependent mechanism. *Anticancer Res.* **24** (2A): 489-494.
- Nagase H. (1998). Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res.* **8** (3): 179-186.
- Nalabothula, N. (2004). Biochemical and biophysical characterization of retinoblastoma protein and its binding partners. Dissertationsarbeit. Technische Universität München.

- Nicholson D. W., Ali A., Thornberry N. A., Vaillancourt J. P., Ding C. K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P. R., Labelle M., Lazebnik Y. A., et al. (1996). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. **376** (6535): 37-43.
- Ohta Y., Suzuki N., Nakamura S., Hartwig J. H., Stossel T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96** (5): 2122-2128.
- Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*. **273** (5280): 1392-1395.
- Osenkowski P., Toth M., Fridman R. (2004). Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J. Cell Physiol*. **200** (1): 2-10.
- Otey C., Griffiths W., Burrridge K. (1990). Characterization of monoclonal antibodies to chicken gizzard talin. *Hybridoma*. **9** (1): 57-62.
- Patel Y. M., Lane M. D. (2000). Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J. Biol. Chem*. **275** (23): 17653-17660.
- Pebernard S., Iggo R. D. (2004). Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation*. **72** (2-3): 103-111.
- Persad S., Attwell S., Gray V., Mawji N., Deng J. T., Leung D., Yan J., Sanghera J., Walsh M. P., Dedhar S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem*. **276** (29): 27462-27469.
- Piechaczyk M. (2000). Proteolysis of p53 protein by ubiquitous calpains. *Methods Mol. Biol*. **144**: 297-307.
- Pozzi A., Zent R. (2003). Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp Nephrol*. **94** (3): e77-e84.
- Park M. J., Park I. C., Lee H. C., Woo S. H., Lee J. Y., Hong Y. J., Rhee C. H., Lee Y. S., Lee S. H., Shim B. S., Kuroki T., Hong S. I. (2003). Protein kinase C- $\alpha$  activation by phorbol ester induces secretion of gelatinase B/MMP-9 through ERK 1/2 pathway in capillary endothelial cells. *Int. J. Oncol*. **22** (1): 137-143.
- Park J. S., Woo M. S., Kim S. Y., Kim W. K., Kim H. S. (2005). Repression of interferon- $\gamma$ -induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in microglia by sodium butyrate is mediated through specific inhibition of ERK signaling pathways. *J. Neuroimmunol*. **168** (1-2): 56-64.
- Popp O., Heidinger M., Ruiz-Heinrich L., Ries C., Jochum M., Gil Parrado S. (2003). The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol. Chem*. **384** (6): 951-958.
- Postovit L. M., Dutt P., Dourdin N., Park M., Greer P. A., Graham C. H., Elce J. S. (2002). Calpain is required for MMP-2 and u-PA expression in SV40 large T-antigen-immortalized cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **297** (2): 294-301.

- Qiao L., Han S. I., Fang Y., Park J. S., Gupta S., Gilfor D., Amorino G., Valerie K., Sealy L., Engelhardt J. F., Grant S., Hylemon P. B., Dent P. (2003). Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* **23** (9): 3052-3066.
- Quinton T. M., Kim S., Dangelmaier C., Dorsam R. T., Jin J., Daniel J. L., Kunapuli S. P. (2002). Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem. J.* **368** (Pt 2): 535-543.
- Raser K. J., Posner A., Wang K. K. (1995). Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* **319** (1): 211-216.
- Rajah R., Lee K. W., Cohen P. (2002). Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth Differ.* **13** (4): 163-171.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J. (2004) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D160-D164.
- Read M. A., Neish A. S., Luscinskas F. W., Palombella V. J., Maniatis T., Collins T. (1995). The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity.* **2** (5): 493-506.
- Reed J. C. (2004). Apoptosis mechanisms: implications for cancer drug discovery. *Oncology (Williston Park).* **18** (13 Suppl 10): 11-20.
- Renshaw M. W., Price L. S., Schwartz M. A. (1999). Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase. *J. Cell. Biol.* **147** (3): 611-618.
- Reverter D., Sorimachi H., and Bode W. (2001). The structure of calcium-free human m-calpain. Implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**: 222-229.
- Reyland M. E., Barzen K. A., Anderson S. M., Quissell D. O., Matassa A. A. (2000). Activation of PKC is sufficient to induce an apoptotic program in salivary gland acinar cells. *Cell Death Differ.* **7** (12): 1200-1209.
- Rios-Doria J., Kuefer R., Ethier S. P., Day M. L. (2004). Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res.* **64** (20): 7237-7240.
- Roelle S., Grosse R., Aigner A., Krell H. W., Czubayko F., Gudermann T. (2003). Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **278** (47): 47307-47318.
- Roman E. A., Ricci A. G., Faletti A. G. (2005). Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **242** (1-2): 33-41.
- Rosette C., Roth R. B., Oeth P., Braun A., Kammerer S., Ekblom J., Denissenko M. F. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* **26** (5): 943-950.

- Rosso F., Giordano A., Barbarisi M., Barbarisi A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell. Physiol.* **199** (2):174-180.
- Rost B., Sander C. (1995). Progress of 1D protein structure prediction at last. *Proteins.* **23** (3): 295-300.
- Rucci N., Digiacinto C., Orru L., Millimaggi D., Baron R., Teti A. (2005). A novel protein kinase C {alpha}-dependent signal to ERK1/2 activated by {alpha}V{beta}3 integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Cell Sci.* **118** (Pt 15): 3263-3275.
- Saad R. S., Jasnosz K. M., Tung M. Y., Silverman J. F. (2003). Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **22** (3): 248-253.
- Saad R. S., Liu Y. L., Nathan G., Celebrezze J., Medich D., Silverman J. F. (2004). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* **17** (2): 197-203.
- Saklatvala J., Nagase H., Salvesen G. (2003). A tribute to Alan J. Barrett. *Biochem. Soc. Symp.* (70): ix-x.
- Sallusto F., Mackay C. R. (2004). Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **16** (6): 724-731.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74** (12): 5463-5467.
- Santoro M. M., Gaudino G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp. Cell. Res.* **304** (1): 274-286.
- Sauer B. (1994). Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5** (5): 521-527.
- Saxena N., Banerjee S., Sengupta K., Zoubine M. N., Banerjee S. K. (2001). Differential expression of WISP-1 and WISP-2 genes in normal and transformed human breast cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* **228** (1-2): 99-104.
- Schaecher K. E., Goust J. M., Banik N. L. (2001). The effects of calpain inhibition upon IL-2 and CD25 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* **119** (2): 333-342.
- Schaller M. D., Borgman C. A., Parsons J. T. (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* **13** (2): 785-791.
- Scherer, W. F., Syverton J. T., Gey G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97** (5): 695-710.

- Schindler A. E. (2004). Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of postoperative adhesions: an overview. *Gynecol. Endocrinol.* **19** (1): 51-55.
- Schlaepfer D. D., Mitra S. K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14** (1): 92-101.
- Schmitz A. A., Govek E. E., Bottner B., Van Aelst L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp. Cell Res.* **261** (1): 1-12.
- Schnaeker E. M., Ossig R., Ludwig T., Dreier R., Oberleithner H., Wilhelmi M., Schneider S. W. (2004). Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res.* **64** (24): 8924-8931.
- Schoenwaelder S. M., Yuan Y., Cooray P., Salem H. H., Jackson S. P. (1997). Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J. Biol. Chem.* **272** (3): 1694-1702.
- Schwartz M. A. (2001). Integrin signaling revisited. *Trends. Cell. Biol.* **11** (12): 4466-70.
- Shea T. B., Beermann M. L., Griffin W. R., Leli U. (1994). Degradation of protein kinase C  $\alpha$  and its free catalytic subunit, protein kinase M, in intact human neuroblastoma cells and under cell-free conditions. Evidence that PKM is degraded by mM calpain-mediated proteolysis at a faster rate than PKC. *FEBS Lett.* **350** (2-3): 223-229.
- Sheng Q., Love T. M., Schaffhausen B. (2000). J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* **74** (11): 5280-5290.
- Sheng T., Li C., Zhang X., Chi S., He N., Chen K., McCormick F., Gatalica Z., Xie J. (2004). Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol. Cancer.* **3**: 29.
- Shibasaki F., Fukami K., Fukui Y., Takenawa T. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase binds to  $\alpha$ -actinin through the p85 subunit. *Biochem. J.* **302** (Pt 2): 551-7.
- Shiraha H., Glading A., Chou J., Jia Z., Wells A. (2002). Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol. Cell. Biol.* **22** (8): 2716-2727.
- Shuman S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269** (51): 32678-32684.
- Simonitsch I., Krupitza G. (1998). Autocrine self-elimination of cultured ovarian cancer cells by tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). *Br. J. Cancer.* **78** (7): 862-870.
- Smith J. W., Cheresch D. A. (1990). Integrin ( $\alpha$  v  $\beta$  3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. *J. Biol. Chem.* **265** (4): 2168-2172.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** (1): 76-85.

- Smith J. W., Vestal D. J., Irwin S. V., Burke T. A., Cheresch D. A. (1990). Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* **265** (19): 11008-11013.
- Sondermann H., Kuriyan J. (2005). C2 can do it, too. *Cell.* **121** (2): 158-160.
- Song X. S., Cao J. L., Xu Y. B., He J. H., Zhang L. C., Zeng Y. M. (2005). Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta. Pharmacol. Sin.* **26** (7): 789-798.
- Soon L. L., Yie T. A., Shvarts A., Levine A. J., Su F., Tchou-Wong K. M. (2003). Overexpression of WISP-1 down-regulated motility and invasion of lung cancer cells through inhibition of Rac activation. *J. Biol. Chem.* **278** (13): 11465-11470.
- Stabach P. R., Cianci C. D., Glantz S. B., Zhang Z., Morrow J. S. (1997). Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry.* **36** (1): 57-65.
- Stalker T. J., Skvarka C. B., Scalia R. (2003). A novel role for calpains in the endothelial dysfunction of hyperglycemia. *FASEB J.* **17** (11): 1511-1513.
- Sternlicht M. D., Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**: 463-516.
- Stossel T. P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig J. H., Noegel A., Schleicher M., Shapiro S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** (2): 138-145.
- Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., Bode W. (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97** (2): 588-592.
- Stumvoll M., Goldstein B. J., van Haeften T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* **365** (9467): 1333-1346.
- Suga K., Hattori H., Saito A., Akagawa K. (2005). RNA interference-mediated silencing of the syntaxin 5 gene induces Golgi fragmentation but capable of transporting vesicles. *FEBS Lett.* **579** (20): 4226-4234.
- Suzuki K. (1991). Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed. Biochim. Acta.* **50** (4-6): 483-484.
- Tadokoro S., Shattil S. J., Eto K., Tai V., Liddington R. C., de Pereda J. M., Ginsberg M. H., Calderwood D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* **302** (5642):103-106.
- Tanabe T., Oyamada M., Fujita K., Dai P., Tanaka H., Takamatsu T. (2005). Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein. *Nat. Methods.* **2** (7): 503-505.



- Tanaka T., Bai Z., Srinoulprasert Y., Yang B. G., Hayasaka H., Miyasaka M. (2005). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci.* **96** (6): 317-322.
- Tannenberg, T. (2000). Antisense-Expression von  $\mu$ - und m-Calpain in human HeLa Zellen. Dissertationsarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität-München
- Tischmeyer W., Grimm R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* **55** (4): 564-574.
- Thorstensen L., Diep C. B., Meling G. I., Aagesen T. H., Ahrens C. H., Rognum T. O., Lothe R. A. (2001). WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Gastroenterology.* **121** (6): 1275-1280.
- Tompa P., Buzder-Lantos P., Tantos A., Farkas A., Szilagyi A., Banoczi Z., Hudecz F., Friedrich P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* **279** (20): 20775-20785.
- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26** (2): 171-176.
- Tsutsui S., Ohno S., Murakami S., Kataoka A., Kinoshita J., Hachitanda Y. (2003). Histological classification of invasive ductal carcinoma and the biological parameters in breast cancer. *Breast Cancer.* **10** (2): 149-152.
- Turk D., Turk B., Turk V. (2003). Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem. Soc. Symp.* (70): 15-30.
- Ulku A. S., Schafer R., Der C. J. (2003). Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells. *Mol. Cancer Res.* **1** (14): 1077-1088.
- Upreti M., Rath P. C. (2005). Expression and DNA binding activity of the recombinant interferon regulatory factor-1 (IRF-1) of mouse. *Mol. Biol. Rep.* **32** (2): 103-116.
- Urthaler F., Wolkowicz P. E., Digerness S. B., Harris K. D., Walker A. A. (1997). MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovasc. Res.* **35** (1): 60-67.
- Vadlamudi R. K., Li F., Adam L., Nguyen D., Ohta Y., Stossel T. P., Kumar R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell. Biol.* **4** (9): 681-690.
- van der Flier A., Sonnenberg A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **305** (3): 285-298.
- Vignoud L., Albiges-Rizo C., Frachet P., Block M. R. (1997). NPXY motifs control the recruitment of the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in focal adhesions independently of the association of talin with the  $\beta 1$  chain. *J. Cell. Sci.* **110** (12): 1421-1430.

- von Bredow D. C., Nagle R. B., Bowden G. T., Cress A. E. (1997). Cleavage of beta 4 integrin by matrilysin. *Exp. Cell. Res.* **236** (1): 341-345.
- Wachsstock D. H., Wilkins J. A., Lin S. (1987). Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146** (2): 554-560.
- Wadhwa R., Yaguchi T., Kaur K., Suyama E., Kawasaki H., Taira K., Kaul S. C. (2004). Use of a randomized hybrid ribozyme library for identification of genes involved in muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **279** (49): 51622-51629. Epub 2004 Sep 24.
- Walker G., Pfeilschifter J., Otten U., Kunz D. (2001). Proteolytic cleavage of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by calpain I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1568** (3): 216-224.
- Weedon, M. N., Schwarz, P. E., Horikawa, Y., Iwasaki, N., Illig, T., Holle, R., Rathmann, W., Selisko, T., Schulze, J., Owen, K. R., Evans, J., Bosque-Plata, L., Hitman, G., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Bell, G. I., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T., Frayling, T. M. (2003). Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1208-1212.
- Wilkinson, K. D. (2004). Ubiquitin C-terminal hydrolase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. eds), p. 1225-1229, Elsevier, London.
- Witke W., Hofmann A., Koppel B., Schleicher M., Noegel A. A. (1993). The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. *J. Cell. Biol.* **121** (3): 599-606.
- Wolf K., Friedl P. (2005). Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion. *Biochimie.* **87** (3-4): 315-320.
- Wozniak M. A., Modzelewska K., Kwong L., Keely P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta.* **1692** (2-3): 103-119.
- Wu M. T., Wu R. H., Hung C. F., Cheng T. L., Tsai W. H., Chang W. T. (2005). Simple and efficient DNA vector-based RNAi systems in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330** (1): 53-59.
- Xiong J. P., Stehle T., Diefenbach B., Zhang R., Dunker R., Scott D. L., Joachimiak A., Goodman S. L., Arnaout M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3. *Science.* **294** (5541): 339-345.
- Xu Y., Mellgren R. L. (2002). Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. *J. Biol. Chem.* **277** (24): 21474-21479.
- Xu L. L., Shi Y., Petrovics G., Sun C., Makarem M., Zhang W., Sesterhenn I. A., McLeod D. G., Sun L., Moul J. W., Srivastava S. (2003). PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Res.* **63** (15): 4299-4304.

- Yan B., Calderwood D. A., Yaspan B., Ginsberg M. H. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **276** (30): 28164-28170.
- Zang C., Liu H., Ries C., Ismail M. G., Petrides P. E. (2000). Enhanced migration of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 under in vitro conditions during short-term all-trans-retinoic acid treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126** (1): 33-40.
- Zhang W., Lane R. D., Mellgren R. L. (1996). The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **271** (31): 18825-18830.
- Zhang W., Lu Q., Xie Z. J., Mellgren R. L. (1997). Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene*. **14** (3): 255-263.
- Zhao X., Duong T., Li X. (2000). Comparison of Living Colors EGFP and dEGFPs as reporters. *Clontechniques* **XV** (2): 29-30.
- Zhou H., Xia X. G., Xu Z. (2005). An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res.* **33** (6): e62.
- Zhou J., Zhu P., Jiang J. L., Zhang Q., Wu Z. B., Yao X. Y., Tang H., Lu N., Yang Y., Chen Z. N. (2005). Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1. *BMC Cell Biol.* **6** (1): 25.
- Zoubine M. N., Banerjee S., Saxena N. K., Campbell D. R., Banerjee S. K. (2001). WISP-2: a serum-inducible gene differentially expressed in human normal breast epithelial cells and in MCF-7 breast tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282** (2): 421-425.

## **G           Anhang**

Die Daten für den Anhang sind auf der CD-ROM „Anhang - Dissertation Oliver Popp“ zusammengefasst:

- ***Vektor-DNA Sequenzen***
  - DNA-Sequenz von pRNAi
  - DNA-Sequenz von pCEFP-C1+*capn2*
  - DNA-Sequenz von pCYFP-N1+*tln*
  - DNA-Sequenz von pCYFP-N1+*tln rod*
  - DNA-Sequenz von pCYFP-N1+*tln head*
- ***Sequenzvergleiche zwischen***
  - humanem und murinem Talin1
- ***Videomaterial von mock, capn1AS und capn2AS***
  - (24 Stunden auf Vitronectin)
- ***Rekonstitution der HeLa-typischen Morphologie bei capn1AS durch Überexpression von Calpain 1*** (Bildmaterial zu Abschnitt D.1.1.9)
  - (*mock*, *capn1AS* und *capn1AS* mit pECFP-C1+*capn1* auf Vitronectin)

## H Curriculum Vitae

### ***Persönliche Daten***

NAME: Oliver Popp  
GEBURTSDATUM UND -ORT: 13. April 1978 in Aschaffenburg  
ADRESSE: Schönbichlstrasse 2  
85354 Freising  
Deutschland  
FAMILIENSTAND ledig  
STAATSANGEHÖRIGKEIT deutsch

### ***Schul Ausbildung***

SEPTEMBER '90 – JULI '94 Staatliche Realschule Aschaffenburg  
SEPTEMBER '94 – JULI '96 Staatliche Fachoberschule Aschaffenburg  
Abschluss: **Fachhochschulreife**

### ***Hochschulausbildung***

OKTOBER '96 – JULI '01 Fachhochschule Weihenstephan, Freising  
*Fachbereich Biotechnologie*  
Diplomarbeit:  
***Dimensionierung und Auslegung eines Rohrbündelwärmetauschers***  
Steinecker GmbH, Freising, und Technische Universität München, *Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik*  
Betreuer: Prof. Dr. Franz Thurner  
Abschluss: **Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH)**

SEIT AUGUST '01 Promotionsarbeit:  
***Isoformspezifische down-Regulierung konventioneller Calpaine: Auswirkungen auf die Migration und andere zelluläre Funktionen***  
Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Betreuung: Dr. Shirley Gil-Parrado und  
Prof. Dr. Marianne Jochum  
und Institut für Biochemie I  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Doktorvater: Prof. Dr. Bernd Wiederanders

## ***Praktika und Fortbildungsmaßnahmen***

- MÄRZ '97 – JUNI '97      1. Praxissemester:  
***Analyse und Quantifizierung von Protein-Gerbstoff-Komplexen in Getränken***  
 Henninger-Bräu AG, Frankfurt
- MAI '98 – AUGUST '98      Wissenschaftliche Hilfskraft:  
***Validierung eines "chemiefreien" Wasserdeionisierers***  
 Fachhochschule Weihenstephan, Freising
- JUNI '98 – SEPTEMBER '98      2. Praxissemester:  
***Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Domäne III von humanen  $\mu$ -Calpain***  
 Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik,  
 Ludwig-Maximilians-Universität München
- MAI '00 – JULI '00      Fortbildungsmaßnahme:  
***Projektleiter und Beauftragter für Biologische Sicherheit***  
 Fachhochschule Weihenstephan, Freising

## ***Lehrtätigkeit***

- MÄRZ '02 – SEPTEMBER '05      Mitbetreuung im ***Praktikum für Klinische Chemie und Hämatologie***  
 Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

## ***Publikationen***

- Popp O.** and Gil-Parrado S. (2005). *Cell cycle control by  $\mu$ -calpain*. Manuskript in Vorbereitung
- Popp O.**, Gerg. M., Zahler S., Fuentes-Prior P., Jochum M. and Gil-Parrado S. (2005). *m-calpain modulates cell motility*. Manuskript in Vorbereitung
- Popp O.**, Tannenbergs T., Zahler S., Holloschi A., Overall C., Jochum M., Sommerhoff C. and Gil-Parrado S. (2005). *Transcriptional regulation of matrix-metalloproteinase-2 by m-calpain: A probable role for typical PKC isoforms*. Manuskript in Vorbereitung
- Joy J., Nalabothula N., Ghosh M., **Popp O.**, Jochum M., Machleidt W., Gil-Parrado S., Holak T. A. (2006). *Identification of calpain cleavage sites in the G1 cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d)*. Biol Chem. 387 (3): 329-335.
- Popp O.**, Heidinger M., Ruiz-Heinrich L., Ries C., Jochum M. and Gil-Parrado S. (2003). *The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukaemic THP-1 cells*. Biol Chem. 384 (6): 951-958.
- Gil-Parrado S., **Popp O.**, Knoch T. A., Zahler S., Bestvater F., Felgentrager M., Holloschi A., Fernandez-Montalvan A., Auerswald E. A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W. and Spiess E. (2003) *Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous m-calpain*. J. Biol. Chem. 278 (18):16336-16346.

Gil-Parrado S., Fernández-Montalván A., Assfalg-Machleidt I., **Popp O.**, Bestvater F., Hollsch A., Knoch T. A., Auerswald E. A., Welsh K., Reed J. C., Fritz H., Fuentes-Prior P., Spiess E., Salvessen G. S. and W. Machleidt (2002). *Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis*. J. Biol. Chem. 277: 27217-27226.

### ***Vorträge und Posterpräsentationen***

KEYSTONE SYMPOSIA “CELL MIGRATION AND INVASION”

Januar 2003, Breckenridge, USA

**Oliver Popp**, Lourdes Ruiz-Heinrich and Shirley Gil-Parrado. *The ubiquitous calpain system in differentiation-stimulated hematopoietic cells*. (Poster)

20<sup>TH</sup> WINTERSCHOOL “PROTEASES AND THEIR INHIBITORS”

März 2003, Tiers, Italien

**Oliver Popp** and Shirley Gil-Parrado. *Interaction between the calpain-calpastatin system and matrix metallo proteinases regulate the invasiveness of leukemia cells*. (Vortrag)

21<sup>TH</sup> WINTERSCHOOL “PROTEASES AND THEIR INHIBITORS”

Februar 2004, Tiers, Italien

**Oliver Popp**, Marianne Jochum and Shirley Gil-Parrado. *Down-regulation of conventional calpains using a DNA vector-based RNAi system*. (Vortrag)

FASEB SUMMER CONFERENCE “BIOLOGY OF THE CALPAINS IN HEALTH AND DISEASE”

Juni 2004, Tucson, USA

**Oliver Popp**, Marianne Jochum and Shirley Gil-Parrado. *Conventional calpains regulate matrigel-invasion: A probable role for PKC isoforms*. (Vortrag /Poster)

22<sup>TH</sup> WINTERSCHOOL “PROTEASES AND THEIR INHIBITORS”

März 2005, Tiers, Italien

**Oliver Popp**, Stefan Zahler, Marianne Jochum and Shirley Gil-Parrado. *Cleavage of talin by m-calpain modulates cell migration*. (Vortrag)

4<sup>TH</sup> GENERAL MEETING OF THE PROTEOLYSIS SOCIETY (IPS)

Oktober 2005, Québec City, Kanada

**Oliver Popp**, Stefan Zahler, Marianne Jochum und Shirley Gil-Parrado. *Cleavage of talin by conventional m-calpain modulates tumor cell migration*. (Vortrag)

### ***Preise und Stipendien***

2001	Preis für exzellente Diplomarbeit vom Verband Deutscher Ingenieure (VDI)
JUNI '03 – MAI '04	Forschungsförderung durch die Medizinischen Fakultät der LMU München im Rahmen des FöFoLe-Programms
2004	Reisestipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
2004	FASEB Reisestipendium
2005	Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung
2005	IPS Reisestipendium

## I Danksagung

Für die Vertretung meiner Promotion an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bin ich Herrn Prof. Dr. Bernd Wiederanders, Leiter des Instituts für Biochemie I am Klinikum der Universität zu außerordentlichem Dank verpflichtet, ebenso wie für sein stetes fachliches Interesse am Fortgang der Arbeit.

Dem Leiter der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität zu Beginn meiner experimentellen Dissertationsarbeit, Herrn Prof. Dr. Hans Fritz, und seiner Nachfolgerin, Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas und die großzügige finanzielle und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente an der Abteilung.

Zudem bin ich Frau Prof. Jochum, Herrn Prof. Fritz, Herrn Prof. Dr. Werner Machleidt und Herrn Dr. Peter Neth für die zahlreichen wertvollen Kommentare und Hilfestellungen bei der Abfassung der Promotionsschrift sehr verbunden.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Shirley Gil-Parrado, die mir im Laufe meiner Promotionsarbeit das Herz für die Wissenschaft geöffnet hat, mich lehrte Gegebenes kritisch zu hinterfragen und ein wahrer Freund geworden ist, bin ich ganz besonders dankbar. Stets war sie zur Beantwortung fachlicher Fragen bereit und motivierte mich fortlaufend, neue Wege zu beschreiten.

Zudem bedanke ich mich herzlich für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung bei folgenden Personen:

- Dr. Peter Neth für die Organisation des hervorragenden Doktorandenseminars sowie für seine Funktion als engagierter und motivierender Ruhepol der Doktoranden in allen Phasen der Labor- und Schreiarbeit;
- Lourdes Ruiz-Heinrich für ihre temperamentvolle, mütterliche Hilfe bei all den kleinen und großen Arbeiten im Labor;
- Annette Lechner, die mir stets in fachlichen und gesellschaftlichen Fragen mit Rat und Tat zu Seite stand und mich als Schreibplatzkollegen ertragen mußte;
- Annemarie Oettl für die schöne Zeit im Praktikum für Klinische Chemie und Hämatologie;
- Dr. Dorit Nägler, Maximilian Fruth und Carolin Boltze für die Begleitung durch den Laboralltag sowie für die heitere und freundschaftliche Gesellschaft;



- Prof. Dr. Werner Machleidt, Dr. Amaury Ernesto Fernandez-Montalvan, Dr. Dietmar Pfeiler, Dr. Irmgard Machleidt, Claudia Geißler, Heide Hinz, Rita Zauner, Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger, PD Dr. Ennes Auerswald und Barbara Meisel für die Einführung in die Calpain-Thematik und das Geleit während meiner Promotionsarbeit;
- Prof. Dr. Christian Sommerhoff für seine fachlichen Anregungen im Institutsseminar und seine Unterstützung sowie Ermutigung, neue berufliche Wege zu beschreiten;
- PD Dr. Stefan Zahler und Dipl.-Ing. Andreas Holloschi für ihre fachliche und technische Unterstützung bei der Herstellung konfokaler Aufnahmen und deren Interpretation;
- Dr. Pablo Fuentes-Prior für seine kompetente Unterstützung bei der Entwicklung der Talin-Mutanten;
- Reinhard Mentele für die stets präzisen und erfolgreichen Proteinsequenzierungen;
- meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen in der Abteilung in alphabetischer Reihenfolge: Marianne Arnhold, Dr. Beatrice Bachmeier, Alexandra Bauer, Marisa Ciccarella, Virginia Egea, Erika Falk, PD Dr. Alexander Faußner, Prof. Dr. Edwin Fink, Dr. Cornelia Gippner-Steppert, Gudrun Godez, Michael Heidinger, Ruza Hell, Clara Höhneke, Jürgen Hoelters, Matthias Illmer, Dr. Irina Kalatskaya, Juliana Maiostre, Maria Meier, Thomas Pitsch, Tanja Popp, Birgit Profanter, Dr. Christian Ries, Boris Rodriguez Porrata, Ursula Sauer, Steffen Schüssler, Cornelia Seidl, Victoryia Sidarovich, Stefan Simon, Josef Steckenbiller, Maria Stein, Sabine Streicher, sowie Kollegen befreundeter Arbeitsgruppen, insbesondere Michael Gerg, Dominic Cuerrier und Edward Fellows für die tatkräftige Unterstützung und die gute Zeit innerhalb und außerhalb des Labors;
- Karola Rügamer-Biese und Evi Themel für die professionelle Hilfe in allen verwaltungstechnischen Fragen und ihre stets freundliche und entgegenkommende Umgangsweise.

Einem wunderbaren Menschen, der mich fünf Jahre lang immer wieder ermutigte und fortwährend ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, fühle ich mich ganz besonders verbunden.

Nicht zuletzt gilt natürlich mein allerherzlichster Dank meinen Eltern Edeltraud und Siegfried Popp für die liebevolle persönliche und großzügige finanzielle Unterstützung sowie für ihre Haltung mich stets in meinen privaten und beruflichen Entscheidungen zu bekräftigten.

---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass

- mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist;
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;
- ich von Frau Dr. Shirley Gil Parrado betreut und angeleitet und bei der Auswertung der konfokalen Mikroskopiebilder von PD Dr. Stefan Zahler unterstützt wurde;
- keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen;
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe;
- ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

München, den 16. Januar 2006

---

Oliver Popp